

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference P11655 Dr.B/La	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP99/07094	International filing date (day/month/year) 22 September 1999 (22.09.99)	Priority date (day/month/year) 25 September 1998 (25.09.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 39/395, 35/14, C07K 16/42, 16/28, 16/30		
Applicant LINDHOFER, Horst		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I Basis of the report
- II Priority
- III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV Lack of unity of invention
- V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI Certain documents cited
- VII Certain defects in the international application
- VIII Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 18 April 2000 (18.04.00)	Date of completion of this report 07 July 2000 (07.07.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/07094

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

the international application as originally filed.

the description, pages 1-30, as originally filed,

pages _____, filed with the demand,

pages _____, filed with the letter of _____

pages _____, filed with the letter of _____

the claims, Nos. 1-23, as originally filed,

Nos. _____, as amended under Article 19,

Nos. _____, filed with the demand,

Nos. _____, filed with the letter of _____

Nos. _____, filed with the letter of _____

the drawings, sheets/fig 1/6-6/6, as originally filed,

sheets/fig _____, filed with the demand,

sheets/fig _____, filed with the letter of _____

sheets/fig _____, filed with the letter of _____

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

the description, pages _____

the claims, Nos. _____

the drawings, sheets/fig _____

3. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/07094

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

the entire international application.

claims Nos. 1-23 with respect to industrial applicability.

because:

the said international application, or the said claims Nos. 1-23 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (specify):

See separate sheet

the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (specify):

the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

no international search report has been established for said claims Nos. _____

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No.
PCT/EP 99/07094**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III

Claims 1-23 relate to subject matter which, in the view of the International Preliminary Examining Authority, falls within the scope of PCT Rule 67.1(iv). Therefore no expert report is established regarding the industrial applicability of the subject matter of these claims (PCT Article 34(4)(a)(i)).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 99/07094

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-23	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-23	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims		YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

This report makes reference to the following documents:

D1: Blood, 88(12), 1996, 4651-4658
 D2: Annual Meeting International Society for
 Experimental Hematology, 25(8), 1997, page 879
 D3: DE-A-197 10 497.

a) Novelty and inventive step

Claim 1 and dependent Claims 2-23 relate to a process for the active immunisation of patients against tumour cells. According to this process, treated tumour cells which are not capable of surviving following reinfusion are injected into the patient; the immunisation effect is strengthened by administering bispecific antibodies whose T cells are directed specifically against the tumour cells. Since the use of bispecific antibodies as well as treated non-viable tumour cells is crucial to this method, the subject matter of Claim 1 differs from that of the X category documents cited in the international search report. Whilst documents D1-D3 relate to the use of bispecific antibodies for combating tumours, none of these documents suggests the reinfusion of treated non-viable tumour cells. In D1 and D3 (see sections cited in the search report) tumor

THIS PAGE BLANK (USP70)

cells are injected into an animal, but these are not treated cells intended to contribute to an active immunisation, but rather untreated, normally proliferating tumour cells which are injected in order to establish a tumour model and subsequently test the use of bispecific antibodies. Bispecific antibodies are used in D2 to cleanse ex vivo peripheral stem cells used in hematopoietic reconstruction following chemotherapy of contaminated tumour cells; treated non-viable tumour cells are not injected.

Therefore the subject matter of Claim 1 appears to be novel (PCT Article 33(2)). Since none of the documents contains any indication of the use of treated non-viable tumour cells in combination with bispecific antibodies to facilitate an active immunisation, Claim 1 also appears to meet the requirements of PCT Article 33(3).

Dependent Claims 2-23 relate to preferred embodiments of the novel and inventive method from Claim 1, and therefore also meet the requirements of PCT Article 33(2) and 33(3).

b) Industrial applicability

The PCT does not contain uniform criteria for assessing the industrial applicability of present Claims 1-23. Patentability may depend on the wording of the claims. The EPO, for example, does not recognise the industrial applicability of claims to the use of a compound in a medical treatment; it does, however, allow claims to the first use of a known compound in a medical treatment or the use of such a compound to manufacture a drug for a new medical treatment.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: VI

EP-A-0 885 614 (D4) was published on 23.12.1998, i.e. after the priority date (25.09.1998) of the present application. This document could therefore only be relevant if the claim to priority proved to be invalid for particular parts of the application. D4 discloses a process for immunisation against tumours which includes the following steps:

- a) isolating autologous tumour cells
- b) treating the tumour cells so as to prevent their survival following reinfusion
- c) incubating the tumour cells thus treated with intact bispecific or trispecific antibodies
- d) reinfusing the antibody-carrying tumour cells.

The antibodies used in D4 are identical with the antibodies according to the present invention.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE IS
BLANK

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
 United States Patent and Trademark
 Office
 Box PCT
 Washington, D.C.20231
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 16 May 2000 (16.05.00)	Applicant's or agent's file reference P11655 Dr.B/La
International application No. PCT/EP99/07094	Priority date (day/month/year) 25 September 1998 (25.09.98)
International filing date (day/month/year) 22 September 1999 (22.09.99)	
Applicant LINDHOFER, Horst et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

18 April 2000 (18.04.00)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
 34, chemin des Colombettes
 1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

S. Mafla

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Abzeichen

PCT/EP 99/07094

C(Fortsetzung) ALS WESENTLICH BESCHREBENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	CAMPBELL F A ET AL: "The role of tumor rejection antigens in host antitumor defense mechanisms." CANCER, (1995 JUN 1) 75 (11) 2649-55. REF: 88 , XP000877103 Seite 2649, linke Spalte, Zeile 21-25 Seite 2651, linke Spalte, Zeile 23-49 Seite 2652, linke Spalte, Zeile 34 -rechte Spalte, Zeile 40	17-22
X	LINDHOFER H ET AL: "BISPECIFIC ANTIBODIES EFFECTIVELY PURGE CANCER CELLS FROM PERIPHERAL BLOOD STEM CELL COLLECTIONS WITHOUT AFFECTING COLONY FORMING UNITS" ANNUAL MEETING INTERNATIONAL SOCIETY FOR EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, XX, XX, Bd. 25, Nr. 8, 24. August 1997 (1997-08-24), Seite 879 XP002048523 das ganze Dokument	1,5-16, 23
X	DE 197 10 497 A (GSF FORSCHUNGSZENTRUM UMWELT) 5. März 1998 (1998-03-05) in der Anmeldung erwähnt Seite 2, Zeile 35 -Seite 3, Zeile 6 Seite 5, Zeile 25-37 Beispiel ALL	1,5-16, 23
P, X	EP 0 885 614 A (GSF FORSCHUNGSZENTRUM UMWELT) 23. Dezember 1998 (1998-12-23) Spalte 3, Zeile 26-37 Beispiel 2 Ansprüche	1-16, 23

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/07094

Patent document cited in search report	Publication dat	Patent family member(s)	Publication dat
DE 19710497 A	05-03-1998	EP 0826696 A JP 10182487 A DE 19649223 A EP 0826695 A JP 10179151 A US 5985276 A	04-03-1998 07-07-1998 05-03-1998 04-03-1998 07-07-1998 16-11-1999
EP 0885614 A	23-12-1998	DE 19725586 A JP 11071288 A	24-12-1998 16-03-1999

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Appl. No.
PCT/EP 99/07094

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K39/395 A61K35/14 //C07K16/42, C07K16/28, C07K16/30

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>LINDHOFER H ET AL: "BISPECIFIC ANTIBODIES TARGET OPERATIONALLY TUMOR-SPECIFIC ANTIGENS IN TWO LEUKEMIA RELAPSE MODELS" BLOOD, US, PHILADELPHIA, PA, vol. 88, no. 12, 15 December 1996 (1996-12-15), pages 4651-4658, XP000616201 ISSN: 0006-4971 abstract page 4654, left-hand column, paragraph 2 -page 4655, left-hand column, paragraph 1</p>	1,4-16, 23
Y	— —/—	17-22

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the International filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

24 February 2000

Date of mailing of the International search report

15/03/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5616 Patentdienst 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Fax. 31 651 890 16
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Covone, M

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inten. Appl. No.
PCT/EP 99/07094

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CAMPBELL F A ET AL: "The role of tumor rejection antigens in host antitumor defense mechanisms." CANCER, (1995 JUN 1) 75 (11) 2649-55. REF: 88 , XP000877103 page 2649, left-hand column, line 21-25 page 2651, left-hand column, line 23-49 page 2652, left-hand column, line 34 -right-hand column, line 40	17-22
X	LINDHOFER H ET AL: "BISPECIFIC ANTIBODIES EFFECTIVELY PURGE CANCER CELLS FROM PERIPHERAL BLOOD STEM CELL COLLECTIONS WITHOUT AFFECTING COLONY FORMING UNITS" ANNUAL MEETING INTERNATIONAL SOCIETY FOR EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, XX, XX, vol. 25, no. 8, 24 August 1997 (1997-08-24), page 879 XP002048523 the whole document	1,5-16, 23
X	DE 197 10 497 A (GSF FORSCHUNGSZENTRUM UMWELT) 5 March 1998 (1998-03-05) cited in the application page 2, line 35 -page 3, line 6 page 5, line 25-37 example ALL	1,5-16, 23
P, X	EP 0 885 614 A (GSF FORSCHUNGSZENTRUM UMWELT) 23 December 1998 (1998-12-23) column 3, line 26-37 example 2 claims	1-16,23

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/07094

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl die Ansprüche 1-23 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der Internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle Internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgetastet sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese Internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser Internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser Internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der Internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Inten	nales Aktenzeichen
PCT/EP 99/07094	

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DE 19710497 A	05-03-1998	EP	0826696 A	04-03-1998
		JP	10182487 A	07-07-1998
		DE	19649223 A	05-03-1998
		EP	0826695 A	04-03-1998
		JP	10179151 A	07-07-1998
		US	5985276 A	16-11-1999
EP 0885614 A	23-12-1998	DE	19725586 A	24-12-1998
		JP	11071288 A	16-03-1999

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 99/07094

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Observation: Although Claims 1-23 relate to a method for treatment of the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Interinal Application No

PCT/EP 99/07094

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
DE 19710497 A	05-03-1998	EP	0826696 A	04-03-1998
		JP	10182487 A	07-07-1998
		DE	19649223 A	05-03-1998
		EP	0826695 A	04-03-1998
		JP	10179151 A	07-07-1998
		US	5985276 A	16-11-1999
EP 0885614 A	23-12-1998	DE	19725586 A	24-12-1998
		JP	11071288 A	16-03-1999

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWAHLENS**

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Annehmers oder Anwalts P11655 Dr. B/La	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übermittlung des Internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 99/07094	Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr) 22/09/1999	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 25/09/1998
Annehmer LINDHOFER, Horst		

Dieser Internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Annehmer gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser Internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

Darüber hinaus liegt Ihnen jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der Sprache ist die Internationale Recherche auf der Grundlage der Internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der Internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der Internationalen Anmeldung offenbarten Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz ist die Internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

in der Internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

zusammen mit der Internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der Internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

wird der vom Annehmer eingereichte Wortlaut genehmigt.

wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

wird der vom Annehmer eingereichte Wortlaut genehmigt.

wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Annehmer kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses Internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 1

wie vom Annehmer vorgeschlagen

weil der Annehmer selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

keine der Abb.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmt Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl die Ansprüche 1–23 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Albenzeichen

PCT/EP 99/07094

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K39/395 A61K35/14 //C07K16/42, C07K16/28, C07K16/30

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	LINDHOFER H ET AL: "BISPECIFIC ANTIBODIES TARGET OPERATIONALLY TUMOR-SPECIFIC ANTIGENS IN TWO LEUKEMIA RELAPSE MODELS" BLOOD, US, PHILADELPHIA, PA, Bd. 88, Nr. 12, 15. Dezember 1996 (1996-12-15), Seiten 4651-4658, XP000616201 ISSN: 0006-4971 Zusammenfassung Seite 4654, linke Spalte, Absatz 2 -Seite 4655, linke Spalte, Absatz 1	1,4-16, 23
Y	—/—	17-22

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
 - "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besondere bedeutsam anzusehen ist
 - "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
 - "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
 - "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
 - "P" Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

Anmeldedatum des Internationalen Recherchenberichts

24. Februar 2000

15/03/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Covone, M

THIS PAGE BLANK (USPTO)



(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : A61K 39/395, 35/14 // C07K 16/42, 16/28, 16/30	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/18435 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. April 2000 (06.04.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/07094		(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 22. September 1999 (22.09.99)		
(30) Prioritätsdaten: 198 44 157.6 25. September 1998 (25.09.98) DE 198 59 115.2 21. Dezember 1998 (21.12.98) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(71)(72) Anmelder und Erfinder: LINDHOFER, Horst [DE/DE]; Bodenseestrasse 12, D-82194 Gröbenzell (DE).		
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): RUF, Peter [DE/DE]; Keltenstrasse 11, D-82296 Schöngesing (DE).		
(74) Anwalt: BEHNISCH, Werner; Reinhard-Skuhra-Weise & Partner GbR, Postfach 44 01 51, D-80750 München (DE).		

(54) Title: TIME-STAGGERED UTILIZATION OF TUMOR CELLS IN COMBINATION WITH INTACT ANTIBODIES FOR IMMUNIZATION

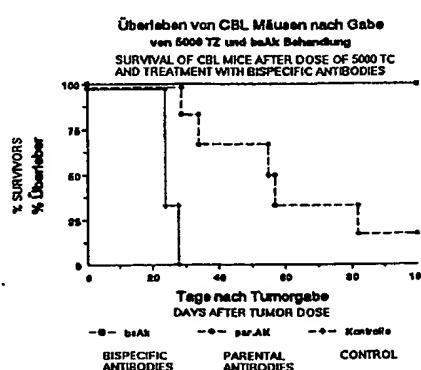
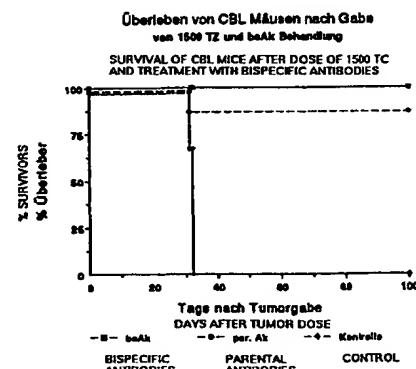
(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON TUMORZELLEN ZEITVERSETZT IN KOMBINATION MIT INTAKTEN ANTIKÖRPERN ZUR IMMUNISIERUNG

(57) Abstract

The invention relates to the time-staggered utilization of tumor cells in combination with intact, preferably heterologous antibodies for the immunization of humans and animals.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung beschreibt die Verwendung von Tumorzellen zeitversetzt in Kombination mit intakten, bevorzugt heterologen Antikörpern zur Immunisierung von Mensch und Tier.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

**Verwendung von Tumorzellen zeitversetzt in Kombination
mit intakten Antikörpern zur Immunisierung**

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Tumorzellen zeitversetzt in Kombination mit intakten, bevorzugt heterologen Antikörpern zur Immunisierung von Mensch und Tier.

Die Immuntherapie durch Antikörper, insbesondere durch bispezifische oder trispezifische Antikörper, hat in den letzten Jahren an Bedeutung stetig zugenommen. Ein wesentliches Problem bei der Verwendung derartiger Antikörper in der Immuntherapie ist beispielsweise die Aktivierung der Immunzellen, z.B. der T-Lymphozyten.

In der DE 196 49 223 und der DE 197 10 495 sind intakte bispezifische und trispezifische Antikörper beschrieben, die zur

Immuntherapie eingesetzt werden. Diese bispezifischen und trispezifischen Antikörper sind befähigt, an eine T-Zelle, zumindest ein Antigen auf einer Zielzelle und durch ihren Fc-Teil oder durch eine dritte Spezifität an Fc-Rezeptor positive Zellen (akzessorische Zellen) zu binden.

Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine neue Verwendungsart eines Kombinationspräparates bereitzustellen, das sowohl Tumorzellen enthält, die so behandelt wurden, daß ihr Überleben nach Reinfusion verhindert wird, als auch intakte bispezifische und/trispezifische Antikörper, die gegen die Tumorzellen gerichtet sind.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß autologe Tumorzellen oder allogene Tumorzellen desselben Tumortyps, die je so behandelt wurden, daß ihr Überleben nach Reinfusion verhindert wird, zeitversetzt in Kombination mit intakten bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörpern, die die nachfolgenden Eigenschaften aufweisen:

- a) Binden an eine T-Zelle;
- b) Binden an zumindest ein Antigen auf einer Tumorzelle;
- γ) Binden durch ihren Fc-Teil (bei bispezifischen Antikörpern) oder durch eine dritte Spezifität (bei trispezifischen Antikörpern) an Fc-Rezeptor positiven Zellen,

an den zu immunisierenden Menschen oder das zu immunisierende Tier verabreicht werden.

Die Tumorzellen und die Antikörper bilden erfindungsgemäß eine funktionelle Einheit und werden in Form einer Kombination verabreicht, um zielgerichtet eine Immunisierung zu erreichen, wobei es für den Erfolg der Verwendung darauf ankommt, daß ihre Anwendung zeitlich abgestuft voneinander erfolgt. Dabei ist es grundsätzlich möglich, zunächst die behandelten Tumorzellen zu verabreichen und, zeitlich abgesetzt hiervon, die Antikörper, oder zunächst die Antikörper an den Patienten zu verabreichen

und, zeitlich abgestuft hiervon, die Tumorzellen.

Der Zeitraum, der zwischen der Verabreichung der Tumorzellen und der Antikörper und vice versa liegt, beträgt bevorzugt ca. 1 - 48 Stunden. Besonders bevorzugt ist ein Zeitraum von 1 - 24 Stunden, weiterhin bevorzugt 1 - 12 Stunden. Weiterhin möglich sind Zeiträume von 1 - 6 Stunden oder 2 - 4 Stunden. Entscheidend für den Erfolg der vorliegenden Erfindung ist die zeitlich abgestufte Anwendung, wobei der anzuwendende Zeitraum auch von der Art des zu behandelnden Tumors und vom verwendeten Antikörper abhängen kann. Die jeweiligen optimalen Zeiträume können anhand von Versuchen vom Fachmann ermittelt werden.

Die verwendeten Tumorzellen sollen möglichst intakt verabreicht werden. Es ist jedoch auch notwendig, daß ihr Überleben nach Reinfusion verhindert wird. Hierzu hat es sich als sinnvoll herausgestellt, die Tumorzellen entweder zu bestrahlen oder durch chemische Agentien am Überleben nach Reinfusion zu verhindern. Durch diese beiden Behandlungsarten bleibt insbesondere die äußere Struktur der Tumorzellen unverändert, d.h. das Erkennungsmuster für die Antikörper.

Zur Bestrahlung wird bevorzugt eine γ -Bestrahlung eingesetzt, die vorzugsweise mit einer Dosis von 20 - 200 Gy erfolgt. Bei einer chemischen Behandlung hat sich Mitomycin C besonders bewährt. Besonders bevorzugt werden heterologe bispezifische und/oder trispezifische Antikörper eingesetzt.

Der Immunisierungserfolg kann dadurch weiter verbessert werden, daß die Antikörper und die Tumorzellen, je zeitlich getrennt voneinander, mehrfach verabreicht werden. Eine weitere Verbesserung der Immunogenität der Tumorzellen ist dadurch erreichbar, daß diese vor Infusion einer Hitzevorbehandlung unterzogen werden. Der bevorzugte Bereich liegt hier bei 41 - 42°C, wobei das Optimum durch Versuche ermittelt werden kann. Bevorzugte Ergebnisse werden bei einer Temperatur von ca. 41,8°C erzielt. Der Zeitraum für die Hitzevorbehandlung beträgt im allgemeinen

1 bis 6 Stunden, bevorzugt ca. 3 Stunden. Der Zeitraum als auch die Temperatur, die optimalerweise eingesetzt werden können, hängen von der Art des zu behandelnden Tumors ab. Die jeweiligen Optima können vom Fachmann anhand von Laborversuchen ermittelt werden.

Wie im syngenen (autologen) murinen Tumormodell gezeigt werden konnte, spielen für eine besonders erfolgreiche Induktion der Immunität auch noch weitere Faktoren eine nicht unerhebliche Rolle. So ist die räumlich korrekte Präsentation des Tumormaterials wichtig. Die Tumorzellen müssen den für eine Immunisierung verantwortlichen Immunzellen im richtigen räumlichen Kontext präsentiert werden. Eine intravenöse (i.v.), intraperitoneale (i.p.) oder subkutane (s.c.) Applikation hat sich hierbei als besonders günstig herausgestellt, da hierdurch der optimale Kontakt in diesen Kompartimenten mit den entsprechenden Immunzellen unter Anwendung der bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörper gewährleistet wird.

Zur erfolgreichen Immunisierung ist es weiterhin vorteilhaft, daß die Menge der verabreichten Tumorzellen in geeigneter Weise ausgewählt wird. So konnte in den Versuchen im murinen Tumormodell gezeigt werden, daß eine zu geringe Anzahl an Tumorzellen nicht den gewünschten Immunisierungserfolg bringt. Eine zu große Menge an Tumormaterial wiederum kann sich nachteilig auswirken, da beispielsweise Toleranzphänomene auftreten können. Überträgt man diese Resultate auf die Situation im Patienten, heißt dies, daß es für den Immunisierungserfolg vorteilhaft ist, eine definierte Menge an Tumormaterial im korrekten räumlichen Kontext mit einer ebenfalls definierten Menge an Antikörpern zu verabreichen. Ein Immunisierungserfolg stellt sich zwar auch dann ein, wenn einer dieser Parameter nicht optimiert wurde; besonders gute Ergebnisse werden jedoch erzielt, wenn sowohl die Mengen des Antikörpers als auch die Menge an Tumormaterial als auch der räumliche Kontext aufeinander abgestimmt und optimiert wurden.

Unter Berücksichtigung der obigen Ausführungen kann bei einer zu geringen Tumorzellzahl beispielsweise nur ein unzureichender Immunschutz etabliert werden. Daher ist es für einen vollständigen Immunisierungserfolg notwendig, mit einer definierten Anzahl an aktivierten Tumorzellen und einer definierten Menge an bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörpern zu immunisieren. Die jeweiligen Zahlen können vom Fachmann anhand von Versuchen etabliert werden.

Die erfindungsgemäß eingesetzten bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörper werden bevorzugt in einer Menge von 5 - 500 µg, weiterhin bevorzugt 10 - 300 µg, 10 - 100 µg oder 10 - 50 µg, je pro Infusion, verabreicht. Die Menge des eingesetzten Antikörpers hängt von der Art des zu behandelnden Tumors, von der Reaktion des Patienten und weiteren Faktoren ab. Die optimalen Mengen können vom Fachmann anhand von Versuchen ermittelt werden.

Die Tumorzellen werden bevorzugt in einer Menge von 10^7 - 10^9 Zellen pro Infusion verabreicht, wobei sich eine Zellzahl von ca. 10^8 als bevorzugt herausgestellt hat. Die Tumorzellen wurden, wie oben ausgeführt, vor der Reinfusion so behandelt, daß ihr Überleben nach Reinfusion verhindert wird, wobei sie wahrscheinlich zusätzlich einer Hitzevorbehandlung unterzogen werden können. Nähere Ausführungen hierzu sind in der vorliegenden Beschreibung enthalten.

Unumgänglich ist jedoch die zeitlich versetzte Verabreichung der Tumorzellen und der Antikörper. Dadurch wird gewährleistet, daß durch die Injektion des bispezifischen und/oder trispezifischen, bevorzugt heterologen Antikörpers in den zu behandelnden Tieren oder Menschen zunächst aufgrund des Überschusses an vorhandenen T-Lymphozyten im peripheren Blut diese über den hochaffinen Bindungsarm gebunden und präaktiviert werden. Zusätzlich können auch vorhandene Fc-Rezeptor positive akzessorische Immunzellen über den Fc-Anteil des bispezifischen oder trispezifischen Antikörpers gebunden werden. Wird nun dieser

Zellkomplex aus T-Zelle und Fc-Rezeptor positiver Zelle über den zweiten hochaffinen Tumorbindungsarm an die vergleichsweise in geringer Anzahl vorhandenen Tumorzellen herangeführt, werden diese durch T-Lymphozyten bzw. Fc-Rezeptor positiven Zellen zerstört und über die in den Zellkomplex eingebundenen Fc-Rezeptor positiven Zellen, beispielsweise Makrophagen, phagozytiert. Dies konnte in einem Versuch mit markierten humanen Monozyten/Makrophagen und Tumorzellen bereits gezeigt werden. In einem nächsten Schritt wird das aufgenommene Tumormaterial prozessiert und über MHC Klasse I und insbesondere Klasse II Moleküle dem Immunsystem präsentiert, was eine wichtige Voraussetzung für die beobachtete humorale Immunantwort darstellt.

Wie das erfindungsgemäße Beispiel zeigt, setzt der Nachweis von tumorreaktiven Antikörpern, die nach einer Therapie gebildet wurden, die Aktivierung von CD4+ tumorspezifischen T-Lymphozyten voraus, die über die T-B-Zell-Kooperation tumorspezifische B-Zellklone stimulieren können. Durch den Nachweis der humoralen Immunantwort konnte somit indirekt ebenfalls eine zelluläre CD4-T-Zellantwort nachgewiesen werden und somit das Überleben der Mäuse als Folge der erfindungsgemäßen zeitlich versetzten Gabe von Tumorzellen und Antikörpern erklärt werden.

BEISPIEL

In einem murinen, autologen Tumormodell wurde der Aufbau eines langanhaltenden Immunschutzes gegen den Tumor mit Hilfe von bsAk untersucht. Hierzu wurde C57BL/6 Mäusen zunächst eine an sich letale Dosis an autologen Melanomzellen verabreicht und zwei Tage später parentale bzw. bispezifische Antikörper nach injiziert. Um zu testen, ob in den Mäusen hierbei ein langanhaltender Immunschutz aufgebaut worden ist, wurden die überlebenden Mäuse nach 100 Tagen einer erneuten Tumorgabe, diesmal jedoch ohne Ak, unterzogen. Um ferner der Frage nachzugehen, inwieweit für die Entwicklung des Immunschutzes die Anzahl an

verabreichten Tumorzellen eine Rolle spielt, wurden die Versuche mit einer niedrigen Tumordosis von 1500 Tumorzellen (TZ) sowie mit einer hohen Dosis von 5000 Tumorzellen durchgeführt. Neben dem Überleben der Mäuse wurde darüber hinaus eine vorhandene humorale Immunantwort gegen den Tumor als Kriterium für einen vorliegenden Immunschutz herangezogen. Hierzu wurden die Seren der Mäuse vor und 100 Tage nach der Behandlung (unmittelbar vor der erneuten Tumorgabe) auf das Vorhandensein von anti-Tumorantikörpern miteinander verglichen.

Die Abbildung 1 zeigt die Überlebenskurven der Mäuse nach der primären Tumorgabe von 1500 bzw. 5000 Tumorzellen. Während die Kontrollmäuse ohne Antikörper-Behandlung alle innerhalb von 35 Tagen verstarben, konnten sämtliche mit bsAk behandelten Mäuse geheilt werden. Im Vergleich hierzu überlebten von den Mäusen, die mit einer Kombination aus den beiden parentalen Ak behandelt wurden, nur 84% nach der niedrigen Tumordosis und nur 16% nach der hohen Tumordosis.

Dieser qualitative Unterschied zwischen den bsAk und den parentalen Ak machte sich auch bei der Ausbildung einer humoralen Immunantwort bemerkbar. Die Abbildung 2 zeigt die in der Durchflußzytometrie gemessene humorale Immunantwort gegen die Tumorzellen. Während die Überlebenden aus der "parentalen Gruppe" keine humorale Immunantwort aufwiesen, zeigte sich dies bei den Mäusen aus der "bispezifischen Gruppe". Besonders wichtig hierfür war allerdings die Menge an verabreichtem Tumormaterial. Es gab einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen mit niedrig- und hochdosierter Tumorgabe. Während nach niedriger verabreichter Tumordosis nur 17% der Mäuse einen starken und 33% einen schwachen Titer aufwiesen, konnte nach der höheren Tumordosis bei 66% der Mäuse ein starker Titer nachgewiesen werden.

Des weiteren korrelieren die gewonnenen Daten zur humoralen Immunantwort eindeutig mit dem Überleben der Mäuse nach erneuter Tumorgabe ohne nachfolgende Antikörper-Injektion. Nur die

Mäuse, die einen starken Antikörper-Titer gegen den Tumor aufgebaut hatten, überlebten die Tumorgabe oder starben stark verzögert im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Immunisierung. Hingegen starben alle Mäuse ohne nachweisbaren Titer zuerst und ohne Verzögerung im Vergleich zur Kontrolle. In Abbildung 3 sind die Überlebenskurven der Mäuse dargestellt, die einer erneuten Tumorgabe unterzogen wurden ohne diese Mäuse anschließend wieder mit Antikörper zu behandeln. Die Mäuse, die eine hohe Primärgabe von 5000 TZ erhalten hatten, besaßen einen deutlichen Überlebensvorteil gegenüber den Mäusen mit einer niedrig dosierten Primärtumorgabe von 1500 TZ.

Nachfolgend werden bevorzugte Ausgestaltungen der Erfindung, insbesondere in Bezug auf die zu verwendenden bispezifischen und trispezifischen Antikörper und die Tumorzellen, offenbart.

Die Tumorzellen werden aus einem Patienten entnommen (autologe Tumorzellen). Um ein Überleben der Tumorzellen nach Reinfusion zu verhindern, werden sie vor dem Inkontaktbringen mit den Antikörpern, was ja erfindungsgemäß erst im Körper erfolgt, in an sich bekannter Weise behandelt, beispielsweise durch Bestrahlung. Erfindungsgemäß sind nicht beliebige Antikörper verwendbar, sondern diese müssen intakt sein, d.h. sie müssen eine funktionellen Fc-Teil besitzen. Bevorzugt sind sie heterologer Natur, d.h. die Antikörper sind aus schweren Immunglobulinketten unterschiedlicher Subklassen (-Kombinationen, auch Fragmente) und/oder Herkunft (Spezies) zusammengesetzt.

Diese intakten heterologen bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörper werden so ausgewählt, daß sie weiterhin die nachfolgenden Eigenschaften aufweisen:

- α - Binden an eine T-Zelle;
- β - Binden an zumindest ein Antigen auf einer Tumorzelle;
- γ - Binden durch ihren Fc-Teil (bei bispezifischen Antikörpern) oder durch eine dritte Spezifität (bei trispezifischen Antikörpern) an Fc-Rezeptor positive Zellen.

Die erfindungsgemäß verwendbaren Antikörper sind befähigt, die Fc-Rezeptor positive Zelle zu aktivieren, wodurch die Expression von Zytokinen und/oder kostimulatorischen Antigenen initiiert oder erhöht wird.

Bei den trispezifischen Antikörpern erfolgt die Bindung an die Fc-Rezeptor positiven Zellen bevorzugt beispielsweise über den Fc-Rezeptor von Fc-Rezeptor positiven Zellen oder auch über andere Antigene auf Fc-Rezeptor positiven Zellen (Antigen-präsentierenden Zellen), wie z.B. den Mannose-Rezeptor.

Durch die erfindungsgemäße, zeitlich abgestufte Anwendung der intakten, bevorzugt heterologen bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörper wird im Patienten eine Tumorimmunität aufgebaut, bevorzugt eine Langzeit-Tumorimmunität. Die Verabreichung (Reinfusion) erfolgt bevorzugt in einem Patienten nach der Behandlung des Primärtumors, bevorzugt bei Patienten in einer minimal residual disease (MRD)-Situation. Bei Patienten mit wenig verbliebenen Tumorzellen, bei denen allerdings die Gefahr eines Rezidivs hoch sein kann, ist die erfindungsgemäß beschriebene zeitlich abgestufte Anwendung besonders erfolgreich.

Die erfindungsgemäß verwendbaren heterologen bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörper sind zum Teil an sich bekannt, zum Teil werden sie aber auch in der vorstehenden Anmeldung zum ersten Mal beschrieben. Ein Beispiel für einen bsAk ist der Antikörper anti-CD3 X anti-EpCAM (GA-733-2) der bei epithelialen Tumoren wie dem Mammacarcinom eingesetzt wird.

Auf der Tumorzelle erfolgt eine Hochregulation von MHC 1, sowie eine Aktivierung der intrazellulären Prozessierungsmaschinerie (Proteasom-Komplex) aufgrund der Freisetzung von Zytokinen (wie z.B. INF- γ und TNF- α) in unmittelbarer Nachbarschaft der Tumorzelle. Die Zytokine werden aufgrund bispezifischer Antikörpervermittelter Aktivierung von T-Zellen und akzessorischen Zellen freigesetzt. D.h. durch den intakten bsAk werden nicht nur Tu-

morzellen zerstört oder phagozytiert, sondern indirekt auch deren Tumorimmunogenität erhöht.

Die Aktivierung der Fc-Rezeptor positiven Zelle durch den bsAk ist von der Subklasse bzw. der Subklassenkombination des bsAk abhängig. Wie in in vitro-Versuchen nachgewiesen werden konnte, sind beispielsweise bsAk der Subklassenkombination Maus-IgG2a/-Ratte-IgG2b in der Lage, an Fc-Rezeptor positive Zellen zu binden und diese gleichzeitig zu aktivieren, was zur Hochregulation bzw. Neuausbildung (Expression) von kostimulatorischen Antigenen, wie z.B. CD40, CD80 oder CD86, auf der Zelloberfläche dieser Zellen führt. Dagegen sind bsAk der Subklassenkombination Maus-IgG1/IgG2b zwar in der Lage an Fc-Rezeptor positive Zellen zu binden (1) Haagen et al., J. Immunology, 1995, 154: 1852-1860, können diese aber offenbar nicht in vergleichbarem Maße aktivieren (2) Gast et al., Cancer Immunol. Immunotherap., 1995, 40: 390.

Während der intakte bsAk die T-Zelle mit einem Bindungsarm (z.B. an CD3 oder CD2) bindet und gleichzeitig aktiviert, können kostimulatorische Signale von der an den Fc-Teil des bsAk gebundenen Fc-Rezeptor positiven Zelle an die T-Zelle übermittelt werden. D.h. erst die Kombination von Aktivierung der T-Zelle über einen Bindungsarm des bsAk und der gleichzeitigen Übertragung von kostimulatorischen Signalen von der Fc-Rezeptor positiven Zelle auf die T-Zelle, führt zu einer effizienten T-Zellaktivierung (Abb. 4A). Tumor-spezifische T-Zellen, die an der Tumorzelle ungenügend aktiviert wurden und anergisch sind, können nach der erfindungsgemäßen ex vivo-Vorbehandlung ebenfalls reaktiviert werden (Abb. 4B).

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Induktion einer Tumorimmunität ist die mögliche Phagozytose, Prozessierung und Präsentation von Tumorbestandteilen durch die vom bsAk herangeführten und aktivierten akzessorischen Zellen (Monozyten/Makrophagen, oder dendritische Zellen). Durch diesen klassischen Mechanismus der Präsentation von Antigenen können sowohl tumorspezifische

CD4- wie auch CD8-positive Zellen generiert werden. Tumorspezifische CD4-Zellen spielen darüberhinaus eine wichtige Rolle für die Induktion einer humoralen Immunantwort im Zusammenhang mit der T-B-Zell Kooperation.

Bispezifische und trispezifische Antikörper können mit einem Bindungsarm an den T-Zellrezeptor-Komplex der T-Zelle, mit dem zweiten Bindungsarm an tumorassoziierte Antigene auf der Tumorzelle binden. Sie aktivieren dabei T-Zellen, die durch Freisetzung von Zytokinen oder Apoptose-vermittelnde Mechanismen die Tumorzellen zerstören. Darüber hinaus besteht offenbar die Möglichkeit, daß T-Zellen im Rahmen der Aktivierung mit bispezifischen Antikörpern tumorspezifische Antigene über ihren Rezeptor erkennen und dadurch eine dauerhafte Immunisierung eingeleitet wird (Abb. 4B). Von besonderer Bedeutung ist dabei der intakte Fc-Teil des bispezifischen oder trispezifischen Antikörpers, der die Bindung an akzessorische Zellen wie z.B. Monozyten/Makrophagen und dendritische Zellen vermittelt und diese veranlaßt selbst zytotoxisch zu werden und/oder gleichzeitig wichtige kostimulatorische Signale an die T-Zelle weiterzugeben. Auf diese Weise kann offensichtlich eine T-Zellantwort u.U. auch gegen bislang unbekannte, tumorspezifische Peptide induziert werden.

Durch Redirektion von u.U. anergisierten, tumorspezifischen T-Zellen an Tumorzellen mittels bispezifischer und/oder trispezifischer Antikörper bei gleichzeitiger Kostimulation derartiger T-Zellen durch akzessorische Zellen welche an den Fc-Teil des bispezifischen oder trispezifische Antikörpers binden, könnte die Anergie von zytotoxischen T-Zellen (CTLs) aufgehoben werden. D.h. eine im Patienten gegen den Tumor existierende T-Zell-Toleranz kann mittels intakter heterologer bispezifischer und/oder trispezifischer Antikörper gebrochen und damit eine dauerhafte Tumorimmunität induziert werden.

Für den letzten Punkt gibt es erste in vivo-Daten aus Mausversuchen, die auf eine derartige dauerhafte Tumorimmunität nach

Behandlung mit einem syngenen Tumor und intakten bsAk hinweisen. In diesen Versuchen überlebten insgesamt 14 von 14 Tieren, die nach einer ersten Tumorinjektion erfolgreich mit bsAk behandelt werden konnten, eine weitere Tumorinjektion 144 Tage nach der ersten Tumorinjektion - ohne eine erneute Gabe von bsAk.

Die erfindungsgemäß eingesetzten Antikörper sind bevorzugt zur Reaktivierung von in Anergie befindlichen, tumorspezifischen T-Zellen befähigt. Weiterhin sind sie zur Induktion von tumorreaktiven Komplement-bindenden Antikörpern und damit zur Induktion einer humoralen Immunantwort in der Lage.

Die Bindung erfolgt bevorzugt über CD3, CD2, CD4, CD5, CD6, CD8, CD28 und/oder CD44 an die T-Zelle. Die Fc-Rezeptor positiven Zellen weisen zumindest einen Fc γ -Rezeptor I, II oder III auf.

Erfindungsgemäß einsetzbare Antikörper sind zur Bindung an Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, "Natural Killer"-Zellen (NK-Zellen) und/oder aktivierte neutrophile Zellen als Fc γ -Rezeptor I und/oder III positive Zellen befähigt.

Die erfindungsgemäß einsetzbaren Antikörper bewirken, daß die Expression von CD40, CD80, CD86, ICAM-1 und/oder LFA-3 als kostimulatorische Antigene oder/und die Sekretion von Zytokinen durch die Fc-Rezeptor positive Zelle initiiert oder erhöht wird. Die Zytokine sind bevorzugt IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, INF- γ und/oder TNF- α .

Die Bindung an die T-Zelle erfolgt bevorzugt über den T-Zell-Rezeptor-Komplex der T-Zelle.

Die erfindungsgemäß einsetzbaren bispezifischen Antikörper sind beispielsweise:

- ein anti-CD3 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder

anti-CD4 X anti-Tumor-assoziertes Antigen- und/oder anti-CD5 X anti-Tumor-assoziertes Antigen- und/oder anti-CD6 X anti-Tumor-assoziertes Antigen- und/oder anti-CD8 X anti-Tumor-assoziertes Antigen- und/oder anti-CD2 X anti-Tumor-assoziertes Antigen- und/oder anti-CD28 X anti-Tumor-assoziertes Antigen- und/oder anti-CD44 X anti-Tumor-assoziertes Antigen-Antikörper ist.

Die erfindungsgemäß einsetzbaren trispezifischen Antikörper sind bevorzugt:

- ein anti-CD3 X anti-Tumor-assoziertes Antigen- und/oder anti-CD4 X anti-Tumor-assoziertes Antigen- und/oder anti-CD5 X anti-Tumor-assoziertes Antigen- und/oder anti-CD6 X anti-Tumor-assoziertes Antigen- und/oder anti-CD8 X anti-Tumor-assoziertes Antigen- und/oder anti-CD2 X anti-Tumor-assoziertes Antigen- und/oder anti-CD28 X anti-Tumor-assoziertes Antigen- und/oder anti-CD44 X anti-Tumor-assoziertes Antigen-Antikörper.

Die erfindungsgemäß einsetzbaren trispezifischen Antikörper weisen zumindest eine T-Zell-Bindungsarm, einen Tumorzell-Bindungsarm und einen an Fc-Rezeptor positive Zellen bindenden Bindungsarm auf. Dieser zuletzt genannte Bindungsarm kann ein anti-Fc-Rezeptor-Bindungsarm oder ein Mannose-Rezeptor-Bindungsarm sein.

Der bispezifische Antikörper ist bevorzugt ein heterologer intakter Ratte/Maus bispezifischer Antikörper.

Mit den erfindungsgemäß einsetzbaren bispezifischen und trispezifischen Antikörpern werden T-Zellen aktiviert und gegen die Tumorzellen redirigiert. Bevorzugt einsetzbare heterologe intakte bispezifische Antikörper werden aus einer oder mehreren der nachfolgenden Isotyp-Kombinationen ausgewählt:

Ratte-IgG2b/Maus-IgG2a,

Ratte-IgG2b/Maus-IgG2b,
Ratte-IgG2b/Maus-IgG3,

Ratte-IgG2b/Human-IgG1,
Ratte-IgG2b/Human-IgG2,
Ratte-IgG2b/Human-IgG3[orientaler Allotyp G3m(st) = Bindung an Protein A],
Ratte-IgG2b/Human-IgG4,

Ratte-IgG2b/Ratte-IgG2c,

Maus-IgG2a/Human-IgG3[kaukasische Allotypen G3m(b+g) = keine Bindung an Protein A, im folgenden mit * gekennzeichnet]

Maus-IgG2a/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Maus-IgG2a/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Maus-IgG2a/Human-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG4/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG4[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3*[C-terminale Region von CH2: > AS-Position 251]-Human-IgG3*[CH3]

Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge-CH2-CH3]

Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG2-[Hinge-CH2-CH3]

Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG3-[Hinge-CH2-CH3],

orientaler Allotyp]

Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge-CH2-CH3]

Human-IgG1/Human-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-
Human-IgG3*- [CH2-CH3]

Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-
IgG4[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3*[C-terminale
Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3*[CH3]

Human-IgG1/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-
IgG4[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3*[C-terminale
Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3*[CH3]

Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-
IgG2[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3*[C-terminale
Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3*[CH3]

Human-IgG1/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-
IgG2[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3*[C-terminale
Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3*[CH3]

Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-
IgG3*- [CH2-CH3]

Human-IgG1/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-
IgG3*- [CH2-CH3]

Human-IgG2/Human-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG2-[Hinge]-Human-
IgG3*- [CH2-CH3]

Human-IgG4/Human-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-
IgG3*- [CH2-CH3]

Human-IgG4/Human-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-
IgG4[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3*[C-terminale

Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3*[CH3]

Maus-IgG2b/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Maus-IgG2b/Human-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Maus-IgG2b/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG4/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG4-[CH2]-Human-IgG3*-[CH3]

HumanIgG1/Ratte[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1[Hinge]-Human-IgG4-[CH2]-HumanIgG3*[CH3]

HumanIgG1/Maus[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1[Hinge]-Human-IgG4-[CH2]-Human-IgG3*[CH3]

Human-IgG4/Human[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG4-[CH2]-HumanIgG3*-[CH3]

Bei den erfindungsgemäß verwendbaren Antikörpern handelt es sich vorzugsweise um monoklonale, chimäre, rekombinante, synthetische, halbsynthetische oder chemisch modifizierte intakte Antikörper mit beispielsweise Fv-, Fab-, scFv- oder F(ab)₂-Fragmenten.

Bevorzugt werden Antikörper oder Derivate oder Fragmente vom Menschen verwendet oder solche, die derart verändert sind, daß sie sich für die Anwendung beim Menschen eignen (sogenannte "humanized antibodies") (siehe z.B. Shalaby et al., J. Exp. Med. 175 (1992), 217; Mocikat et al., Transplantation 57 (1994), 405).

Die Herstellung der verschiedenen oben genannten Antikörperty-

pen und -fragmente ist dem Fachmann geläufig. Die Herstellung monoklonaler Antikörper, die ihren Ursprung vorzugsweise in Säugetieren, z.B. Mensch, Ratte, Maus, Kaninchen oder Ziege, haben, kann mittels herkömmlicher Methoden erfolgen, wie sie z.B. in Köhler und Milstein (Nature 256 (1975), 495), in Harlow und Lane (Antibodies, A Laboratory Manual (1988), Cold Spring Harbor) oder in Galfré (Meth. Enzymol. 73 (1981), 3) oder der DE 195 31 346 beschrieben sind.

Ferner ist es möglich, die beschriebenen Antikörper mittels rekombinanter DNA-Technologie nach dem Fachmann geläufigen Techniken herzustellen (siehe Kurucz et al., J. Immunol. 154 (1995), 4576; Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sc. USA 90 (1993), 6444).

Die Herstellung von Antikörpern mit zwei verschiedenen Spezifitäten, den sogenannten bispezifischen Antikörpern, ist zum einen durch Anwendung rekombinanter DNA-Technologie möglich, aber auch durch die sogenannte Hybrid-Hybridoma-Fusionstechnik (siehe z.B. Milstein et al., Nature 305 (1983), 537). Hierbei werden Hybridomazelllinien, die Antikörper mit jeweils einer der gewünschten Spezifitäten produzieren, fusioniert und rekombinante Zelllinien identifiziert und isoliert, die Antikörper mit beiden Spezifitäten produzieren.

Das der Erfindung zugrunde liegende Problem kann sowohl durch bispezifische als auch trispezifische Antikörper gelöst werden, sofern sie die im Anspruch 1 gekennzeichneten Eigenschaften und Wirkungen aufweisen. Nachfolgend wird die Herstellung von Antikörpern mit Zwei- und Dreispezifitäten näher beschrieben. Die Bereitstellung derartiger bispezifischer und trispezifischer Antikörper gehört zum Stand der Technik, und auf die derartige Herstellungstechniken beschreibende Literatur wird hier voll inhaltlich Bezug genommen.

Die Herstellung von Antikörpern mit drei Spezifitäten, sogenannten trispezifischen Antikörpern, durch die das der Erfin-

dung zugrundeliegende Problem ebenfalls lösbar ist, kann beispielsweise derart erfolgen, daß an eine der schweren Ig-Ketten eines bispezifischen Antikörpers eine dritte Antigenbindungsstelle mit einer weiteren Spezifität, z.B. in Form eines "single chain variable fragments" (scFv), angekoppelt wird. Das scFv kann beispielsweise über einen

-S-S(G_nS)_nD-I-Linker

an eine der schweren Ketten gebunden sein (S = Serin, G = Glycin, D = Aspartat, I = Isoleucin).

Analog dazu können trispezifische F(ab)₂-Konstrukte hergestellt werden, indem die CH2-CH3-Regionen der schweren Kette einer Spezifität eines bispezifischen Antikörpers ersetzt werden durch ein scFv mit einer dritten Spezifität, während die CH2-CH3-Regionen der schweren Kette der anderen Spezifität beispielsweise durch Einbau eines Stopcodons (am Ende der "Hinge"-Region) in das codierende Gen, z.B. mittels homologer Rekombination, entfernt werden (siehe Abb.5).

Möglich ist auch die Herstellung trispezifischer scFv-Konstrukte. Hierbei werden drei VH-VL-Regionen, die drei verschiedene Spezifitäten repräsentieren, hintereinander in Reihe angeordnet (Abb.6).

Erfindungsgemäß werden z.B. intakte bispezifische Antikörper verwendet. Intakte bispezifische Antikörper sind aus zwei Antikörper-Halbmolekülen (je eine H- und L-Immunglobulinkette), die jeweils eine Spezifität repräsentieren, zusammengesetzt, und besitzen darüber hinaus, wie normale Antikörper auch, einen Fc-Teil mit den bekannten Effektorfunktionen. Sie werden bevorzugt durch die Quadrom-Technologie hergestellt. Dieses Herstellungsverfahren ist beispielhaft in der DE-A-44 19 399 beschrieben. Auf diese Druckschrift, auch bzgl. einer Definition der bispezifischen Antikörper, wird zur vollständigen Offenbarung vollinhaltlich Bezug genommen. Selbstverständlich sind auch andere Herstellungsverfahren einsetzbar, solange sie zu den erfindungsgemäß notwendigen intakten bispezifischen Antikörpern der

angeführt, die erfindungsgemäß direkt am Tumor reaktiviert werden können. Dies kann durch ein bsF(ab')2-Fragment mit den Spezifitäten anti-CD64Xanti-tumorassoziiertes Antigen nicht erreicht werden.

3. Ein bsF(ab')2-Fragment mit den Spezifitäten anti-CD64Xanti-tumorassoziiertes Antigen kann lediglich eine Tumorimmunität in 30% der Patienten erzielen, während erfindungsgemäß in Mausversuchen mit T-Zell-redirigierenden intakten bsAk ein Schutz in 100% der Tiere erzielt werden konnte.

Die Bindung des bsAk an Fc γ -RI besitzt zwei wesentliche Vorteile im Hinblick auf eine optimale anti-Tumorwirksamkeit:

- (1) Fc γ -RI positive Zellen besitzen die Fähigkeit mittels ADCC Tumorzellen zu eliminieren und können insofern synergistisch zur anti-Tumorwirkung der durch den bsAk an die Tumorzelle herangeführten cytotoxischen T-Zellen beitragen.
- (2) Fc γ -RI positive Zellen (wie z.B. Monozyten/Makrophagen/-Dendriten) sind in der Lage, wichtige kostimulatorische Signale, ähnlich wie bei der Antigen-Präsentation, der T-Zelle zu liefern und damit eine Anergisierung der T-Zelle zu verhindern. Wie in Abbildung 4 gezeigt können weiterhin, als erwünschtes Nebenprodukt, aufgrund der durch intakten bsAk vermittelten Interaktion von T-Zelle mit akzessorischer Zelle und Tumorzelle sogar T-Zellen, deren T-Zellrezeptor tumorspezifische Peptide (über MHC Antigene auf der Tumorzelle präsentiert) erkennt, stimuliert werden. Die für eine korrekte Aktivierung der T-Zelle notwendigen Kostimuli würden in dieser Konstellation von der akzessorischen Zelle (z.B. Monocyt) geliefert werden. Insofern sollte der erfindungsgemäße Antikörper neben der direkten T-Zellrezeptor-unabhängigen, durch bsAk vermittelten Tumorerstörung (Abb.4A) ebenfalls tumorspezifisch T-Zellen aktivieren und generieren (Abb.4B), die nach Ab-

obigen Definition führen.

Beispielsweise können in einem neu entwickelten Herstellungsverfahren (6) intakte bispezifische Antikörper in ausreichender Menge produziert werden. Die Kombination von 2 bispezifischen Antikörpern gegen 2 unterschiedliche tumorassoziierte Antigene (z.B. c-erb-B2, ep-cam, beispielsweise GA-733-2 = C215) auf den Mammakarzinomzellen minimiert die Gefahr, daß Tumorzellen, die nur ein Antigen exprimieren, unerkannt bleiben.

Es wurde auch versucht, durch Behandlung mit bispezifischen F(ab')2-Fragmenten mit den Spezifitäten anti-c-erb-B2 x antiCD64 eine Tumorimmunität zu erreichen. Der Hauptnachteil von bsF(ab')2-Fragmenten liegt darin, daß aufgrund der verwendeten Spezifitäten lediglich Fc γ RI+ Zellen an den Tumor redirigiert werden. T-Zellen werden durch diesen bispezifischen Antikörper nicht an den Tumor redirigiert. Die Fc γ RI+ Zellen können zwar indirekt durch Präsentation von tumorspezifischen Peptiden (über MHC I bzw. MHCII) nach z.B. Phagozytose von Tumorzellbestandteilen tumorspezifische T-Zellen aktivieren, die Effizienz der Induktion einer Tumorimmunität ist hier aber niedriger, da T-Zellen durch diesen bsAK nicht gebunden werden und auch nicht zur Kostimulation der Fc-Rezeptor positiven Zellen beitragen können.

Weitere Vorteile von intakten bsAk mit der Fähigkeit zur Redirektion von T-Zellen gegenüber den o.g. bsF(ab')2 Fragmenten sind im einzelnen:

1. An intakte bsAk können Fc-Rezeptor positive Zellen binden und einerseits über ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) direkt zur Tumorerstörung beitragen sowie andererseits wie oben näher ausgeführt zur T-Zellaktivierung.
2. Durch intakte T-Zell-redirigierende bsAk werden auch anergisierte tumorspezifische T-Zellen an die Tumorzelle her-

bau der bsAk weiterhin im Patienten patrouillieren. D.h. mittels intakter bsAk kann ähnlich wie bei gentherapeutischen Ansätzen (z.B. durch Einbau von kostimulatorischen Antigenen wie B-7 in die Tumorzelle) die Tumortoleranz im Patienten durchbrochen werden.

Günstig in diesem Zusammenhang ist weiterhin, daß die Expression von Fc γ -RI nach G-CSF -Behandlung auf den entsprechenden Zellen hochreguliert wird.

Die erfindungsgemäß eingesetzten intakten, bevorzugt heterologen spezifischen und/oder trispezifischen Antikörper weisen in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung die nachfolgenden Eigenschaften auf:

- a) Binden an eine T-Zelle;
- b) Binden an zumindest ein Antigen auf einer Zielzelle;
- c) Binden durch ihren Fc-Teil (bei bispezifischen Antikörpern) oder durch eine dritte Spezifität (bei trispezifischen Antikörpern) an Fc-Rezeptor positive Zellen

und sie induzieren hierdurch eine Immunantwort und/oder zerstörte Zielzellen, wobei der Antikörper so ausgewählt ist, daß er an ein Oberflächenantigen als Zielantigen auf der Zielzelle bindet, welches induzierbar ist und im nicht induzierten Zustand (Normalzustand) auf der Zielzelle nicht vorkommt oder in einer derart geringen Zahl, daß die Anzahl für eine Zerstörung der Zielzelle nicht ausreicht. (Abb. 7A + B)

Es konnte gezeigt werden, daß nach Induktion bereits eine relativ geringe Anzahl der Zielantigene auf der Zielzelle ausreichend ist, um die intakten bispezifischen und trispezifischen Antikörper zu binden und eine Zerstörung der Zielzelle und/oder eine Immunantwort einzuleiten. Unter "geringe Anzahl" wird erfindungsgemäß eine Anzahl von Zielantigenen auf der Zielzelle von mehr als 100 Zielantigenen pro Zielzelle, bevorzugt mehr als 300 und weiterhin bevorzugt mehr als 1000 Zielantigenen pro

Zelle verstanden. Die induzierbaren Zielantigene können auch in einer Menge von bis zu 500.000 pro Zielzelle vorliegen, wobei auch Mengen bis zu 400.000, bis zu 300.000, bis zu 200.000 oder bis zu 100.000 pro Zielzelle induzierbar sind. Ein weiterer bevorzugter Mengenbereich, in dem die Zielantigene vorliegen können, ist von 50.000 bis 100.000 und von 5000 bis 50.000.

Beispiele für induzierbare Oberflächenantigene auf Zielzellen (Zielantigene), die für eine Immuntherapie durch intakte bispezifische und trispezifische Antikörper einsetzbar sind, sind Hitzeschock-Proteine und "MHC-Klasse I-verwandte" MIC-Moleküle. Hitzeschock-Proteine (Hsp) werden von der Zelle als Antwort auf Zellstress synthetisiert. Unter "Zellstress" ist erfindungsgemäß beispielsweise eine Entartung der Zelle, das Einwirken von Strahlen, chemischen Substanzen und von erhöhter Temperatur auf die Zelle sowie die Infektion der Zelle durch Mikroorganismen zu subsumieren. Zur Zeit sind vier Familien von Hitzeschock-Proteinen bekannt, die aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichts differenziert werden. Diese Familien werden als Hsp25, Hsp60, Hsp70 und Hsp90 bezeichnet, wobei die Zahl das ungefähre Molekulargewicht der Stressproteine in Kilo-Dalton wiedergibt. Die Hitzeschock-Proteine zeichnen sich durch hochkonservierte Aminosäuresequenzen aus, wobei der Grad der Kon servierung bei über 35 % Aminosäure-Identität, bevorzugt bei 35 - 55 %, weiterhin bevorzugt 55 - 75% und am bevorzugtesten zwischen 75 % bis 85 % Aminosäure-Identität liegt.

Auf folgende Übersichtsartikel wird verwiesen: Annu. Rev. Genet. 27, 437-496 (1993); Biochimie 76, 737-747 (1994); Cell. Mol. Life Sci. 53, 80-129, 168-211 (1997); Experientia 48, 621-656 (1992); Kabakov u. Gabai, Heat Shock Proteins and Cytoprotection, Berlin: Springer 1997.

Hitzeschock-Proteine werden im Normalfall auf gesundem Geweb nicht exprimiert. Es gibt jedoch Untersuchungen, die zeigen, daß Hitzeschock-Proteine beispielsweise auf Tumorzelllinien und auf Tumormaterial aus Patienten exprimiert werden können (Mel-

cher et al., *Nature Medicine*, 4:581, 1998). Die Expression der Hitzeschock-Proteine auf den Tumorzelllinien ist aber relativ schwach und deshalb für bisher bekannte immuntherapeutische Ansätze mit monoklonalen Antikörpern und unvollständigen (F(ab)2) bispezifischen Antikörpern ungeeignet.

Beispiele für Hitzeschock-Proteine sind Hsp60 und Hsp70/72.

Gleiches gilt für MIC-Moleküle. Auch diese Moleküle sind durch Zellstress, wie oben näher definiert, induzierbar. MIC-Moleküle sind MHC I-verwandte Moleküle, die unter Kontrolle von Hitzeschock-Promoter-Elementen stehen (Groh et al., *PNAS* 93: 12445, 1996). Beispiele für MIC-Moleküle sind MIC A und MIC B. Auch für MIC-Moleküle konnte gezeigt werden, daß sie auf Normalgewebe nicht oder nur in so geringer Menge exprimiert werden, daß sie als Zielstruktur zur Erkennung durch einen Antikörper, um eine Zerstörung der Zielzelle zu erreichen, nicht geeignet sind, während sie auf beispielsweise epithelialen Tumoren in einer solchen Menge exprimiert werden, daß sie durch die erfindungsgemäß bereitgestellten bispezifischen und trispezifischen Antikörper bei einer Immuntherapie als Zielantigene einsetzbar sind.

Die erfindungsgemäß bereitgestellten intakten bispezifischen oder trispezifischen Antikörper werden so ausgewählt, daß sie gegen zumindest ein Zielantigen auf einer Zielzelle gerichtet sind, welches induzierbar ist und auf der Zielzelle im nicht induzierten Zustand nicht oder im wesentlichen nicht vorkommt. Diese Zahl liegt beispielsweise bei ca. 100 Zielantigenen/Zelle. Dies heißt jedoch nicht, daß derartige Zielantigene auf anderen Zellen, d.h. Nicht-Zielzellen, nicht vorkommen können. Beispielsweise kommen auf sich schnell regenerierendem Gewebe, z.B. den Schleimhautzellen des Magen-Darm-Traktes, auch im physiologischen Zustand, konstitutiv exprimiert, Hitzeschockproteine vor. Diese Hitzeschockproteine werden jedoch von der vorliegenden Erfindung nicht mit umfaßt, da sie nicht induzierbar

sind, sondern bereits auf Normalgewebe vorkommen. Bei Verwendung der erfindungsgemäßen Antikörper, die gegen Hitzeschockproteine gerichtet sind, können auch bestimmte Schleimhautzellen des Magen-Darm-Traktes zerstört werden, da diese, wie oben ausgeführt, konstitutiv Hitzeschockproteine auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Die mögliche Zerstörung dieser Zellen ist für einen Patienten zwar mit gewissen Nachteilen verbunden, die jedoch im Vergleich zur erzielbaren Tumorzerstörung gering anzusetzen sind.

Das sich schnell regenerierende Gewebe ist somit nicht primäres Target der erfindungsgemäßen Antikörper, kann jedoch dann von den Antikörpern "getroffen" werden, wenn der erfindungsgemäße Antikörper nicht nur die induzierbaren Zielantigene auf der Zielzelle erkennt, sondern diese Antigene z.B. auch auf sich schnell regenerierendem Gewebe vorkommen. Da sich dieses Gewebe jedoch schnell teilt, kann nach Absetzen der Antikörper-Therapie der ursprüngliche Zustand dieses Gewebes relativ rasch so wieder hergestellt werden, daß es seine physiologische Aufgabe wieder erfüllen kann. Die Erfindung ist also nicht darauf gerichtet, daß die erfindungsgemäßen bispezifischen und trispezifischen Antikörper Antigene auf z.B. sich schnell regenerierendem Gewebe erkennen, welche dort unter Umständen konstitutiv exprimiert werden, sondern die Erfindung umfaßt ausschließlich solche Antikörper, die gegen Zielantigene gerichtet sind, die auf der Zielzelle induzierbar sind und nach Induktion, beispielsweise auch konstitutiv, exprimierbar sind.

Erfindungsgemäß werden unter "induzierbar" solche Zielantigene verstanden, die hier operationell tumorspezifisch sind und im physiologischen Zustand auf der Zelle nicht oder nur in einer solchen Anzahl vorkommen, daß eine Immunantwort gegen sie nicht induzierbar ist oder eine Zerstörung der Zielzellen aufgrund dieser geringen Anzahl nicht oder in einem nicht wesentlichen, therapeutisch nutzbaren Umfang stattfindet.

Als induzierbare Zielantigene auf einer Zielzelle sind nicht

nur solche auf einer Tumorzelle zu verstehen, sondern auch Antigene, die induziert werden, wenn die Zielzelle beispielsweise durch einen Mikroorganismus infiziert wird. Unter "Mikroorganismus" wird erfindungsgemäß jeder Organismus verstanden, der die Zielzelle so beeinflußt, daß auf seiner Oberfläche ein vom Mikroorganismus induziertes Zielantigen im oben beschriebenen Umfang exprimiert wird. Unter Mikroorganismen werden erfindungsgemäß beispielsweise Bakterien, Viren, Protozoen und Pilze verstanden. Zu den Bakterien gehören beispielsweise Gram-positive und Gram-negative Bakterien, Mycoplasmen und Rickettsien. Von den Protozoen mitumfaßt werden insbesondere Plasmiden. Von den Viren umfaßt werden beispielsweise Retroviren, Adenoviren, Herpesviren, Hepatitis-Viren, Togaviren, Pockenviren usw. Entscheidend ist, daß in Zellen, die von einem oder mehreren dieser Mikroorganismen infiziert wurden, auf der Zelloberfläche Antigene exprimiert werden, die durch die Mikroorganismen-Infektion induziert werden. Dabei handelt es sich um Antigene, die von den Zielzellen als Antwort auf die Mikroorganismen-Infektion produziert werden und auf der Zelloberfläche erscheinen (wirtseigene Antigene), nicht dagegen um Zielantigene, die durch die Mikroorganismen selbst produziert werden. Die Infektion einer Zielzelle durch einen Mikroorganismus führt ebenfalls zu einer Zellstreß-Situation für die Zelle, die als Antwort hierauf die Expression bestimmter Proteine induziert, beispielsweise von Hitzeschock-Proteinen und von MIC-Proteinen.

Die erfindungsgemäß bereitgestellten intakten bispezifischen und trispezifischen Antikörper führen nicht nur einen Typ von Immunzellen, sondern T-Zellen und akzessorische Zellen an die Zielzelle heran, und sie sind aus diesem Grund für die Erkennung induzierbarer Oberflächenantigene als operationelle Zielstrukturen besonders geeignet. Es konnte gezeigt werden, daß bereits wenige Zielantigene in einer Menge von 100 bis 5000 pro Zelle auf der Zielzelle ausreichend sind, um diese zu zerstören. Die hierzu durchgeföhrten in vitro-Experimente mit Stammzellpräparaten (PBSZ) sind im nachfolgenden Beispiel A beschrieben. Somit ist die erfindungsgemäße Klasse intakter bi-

spezifischer und trispezifischer Antikörper befähigt, auch bei einer sehr geringen Expression der Zielantigene Tumorzellen oder Zielzellen zu zerstören oder nach deren Erkennung eine Immunantwort zu initiieren.

Die erfindungsgemäßen Antikörper können, da sie gegen induzierbare Antigene gerichtet sind, dazu beitragen, das Problem fehlender zielzellspezifischer, für eine Immuntherapie notwendige Zielantigene auf Tumorzellen und auf durch Mikroorganismen infizierten Zellen zu lösen. Da derartige induzierbare Antigene nicht nur auf Tumorzellen vorkommen, sondern generell in Stresssituationen produziert werden, können auch Erkrankungen immuntherapeutisch angegangen werden, die durch Infektion von beispielsweise Viren, Einzellern, Bakterien oder Pilzen ausgelöst wurden. Hierbei handelt es sich um die oben bereits näher beschriebenen MIC-Moleküle und Hitzeschock-Proteine.

BEISPIEL 1

Nachdem in präklinischen Tiermodellen die herausragende Wirksamkeit von intakten bsAk nicht nur in vitro, sondern auch in vivo belegt werden konnte (Lindhofer et al., Blood, 88:4651, 1996), wurde die Reinigung von Stammzellpräparaten von kontaminierten Tumorzellen als weitere Anwendungsmöglichkeit entwickelt (Lindhofer et al., Exp. Hematol. 25:879, 1997).

Auf diesen Versuchen aufbauend, konnte in Folgeversuchen mit kompletten Stammzellpräparaten (ca. 2×10^{10} Zellen), insbesondere die Wirksamkeit im untergesättigten Bereich der Zielantigene nachgewiesen werden. D.h. es wurde, in Titrationsversuchen, so wenig intakter bsAk verabreicht, daß in einem PBSZ (Periphere Blut-Stammzellen)-Präparat mit ca. $6,5 \times 10^9$ T-Zellen, bei einer Gabe von 5µg Antikörper/Präparat, lediglich 3000 CD3 Moleküle von ca. 30.000 CD3 Molekülen/T-Zelle mit dem bsAk gebunden vorlagen (siehe Berechnung). Trotzdem waren die intak-

ten bsAk in der Lage, auch unter diesen Bedingungen, die Zielzellen (hier Tumorzelle: HCT-8) zu zerstören.

Die Versuche waren so aufgebaut, daß von derartig behandelten PBSZ-Präparaten Aliquots entnommen und mit einer definierten Menge von Tumorzellen kontaminiert wurden. Es konnte gezeigt werden, daß die Tumorzellen selbst bei dieser geringen Konzentration von intakten bsAk, bei der nur ein Teil der Zielantigene besetzt vorliegen, zerstört werden.

Die Auswertung des oben beschriebenen Experiments führte zu folgenden Ergebnissen:

Patient WaGr Gesamtzellzahl PBSZ: $2,5 \times 10^{10}$ + 5 µg bsAk

Aliquot 5×10^6 PBSZ + bsAk + Tumorzellen

Platte	kein Antikörper	bsAk anti- CD3Xepcam	Tumorzellen/mononukleäre Zellen (PBSZ)/Loch
24er	6/6*	0/6°	2×10^4 / 2×10^6
96er	12/12	0/12	5000 / 5×10^5
Tumor- reduktion: keine		>5log	Tumorzellanteil: 1% ° $\Sigma = 1,2 \times 10^5$ Tumorz./6- Löcher

- * Anzahl der Löcher mit Tumorwachstum, von 6 bzw. 12 plattierten Löchern, nach 14 Tagen Kultivierung.
- ° Titrationsversuche mit der Tumorzelllinie HCT-8 haben ergeben, daß bereits 1-2 Tumorzellen/Loch ausreichen, um nach 14 Tagen Kultivierung ein deutliches visuell auswertbares Tumorwachstum in 95% aller plattierten Löcher darzustellen.

Berechnung:

Ein intakter bsAk hat ein Molekulargewicht von 150 KDa. D.h. 1 Mol sind 150 Kg und entsprechen definitionsgemäß 6×10^{23} Molekülen. Damit entsprechen 5 µg ca. 2×10^{13} Molekülen.

Nachdem in einem Stammzellpräparat $6,5 \times 10^9$ T-Zellen bestimmt wurden und eine T-Zelle ca. 30.000 CD3 Moleküle trägt, kommt man auf eine Gesamtzahl von $19,5 \times 10^{13}$ CD3 Molekülen im Stamm-

zellpräparat.

Da jeder bsAk einen anti-CD3 Bindungsarm besitzt, kann gefolgert werden, daß theoretisch, setzt man die beiden oben berechneten Molekülmengen in Bezug, in diesem konkreten Beispiel nicht mehr als ca. 3000 CD3 Moleküle von den bsAk besetzt werden können.

L I T E R A T U R

1. Haagen et al., Interaction of human monocyte Fc γ receptors with rat IgG2b, *J. Immunolog.*, 1995, 154: 1852-1860
2. Gast G.C., Haagen I.-A., van Houten A.A., Klein S., Duits A.J., de Weger R.A., Vroom T.M., Clark M.R., J. Phillips, van Dijk A.J.G., de Lau W.B.M., Bast B.J.E.G. CD8 T-cell activation after intravenous administration of CD3 X CD19 bispecific antibody in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Immunol. Immunother.* 40: 390, 1995
3. Tenny, C., Jacobs, S., Stoller, R., Earle, M., and Kirkwood, J. Adoptive cellualr immunotherapy with high-dose chemotherapy and autologous bone marrow rescue (ABMR) for recurrent breast cancer (meeting abstract). *Proc.Annu.Meet.Am.Soc.Clin.Oncol*; 11: A88, 1992 ISSN: 0736-7589. CO: PMAODO - 7589 CO, 1993.
4. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy - 133 randomised trials involving 31 000 recurrences and 24 000 deaths among 75 000 women. Part II *Lancet* 339: 71-85, 1992
5. Guo et al., Effective tumor vaccines generated by in vitro modification of tumor cells with cytokines and bispecific monoclonal antibodies. *Nature Medicine* 3: 451, 1997
6. Lindhofer et al., Preferential species-restricted heavy-light chain pairing in rat-mouse quadromas: Implications for a single step purification of bispecific antibodies, *J. Immunology* 1995, 155:219

Verwendung von Tumorzellen zeitversetzt in Kombination
mit intakten Antikörpern zur Immunisierung

PATENTANSPRÜCHE

1. Verwendung autologer Tumorzellen oder allogener Tumorzellen desselben Tumortyps, die je so behandelt wurden, daß ihr Überleben nach Reinfusion verhindert wird, in zeitlich abgestufter Anwendung mit intakten bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörpern mit den nachfolgenden Eigenschaften:
 - a) Binden an eine T-Zelle;
 - b) Binden an zumindest ein Antigen auf einer Tumorzelle;
 - γ) Binden durch ihren Fc-Teil (bei bispezifischen Antikörpern) oder durch eine dritte Spezifität (bei tri-

spezifischen Antikörpern) an Fc-Rezeptor positiven Zellen,

wobei dem zu immunisierenden Menschen oder dem zu immunisierenden Tier die Tumorzellen und die gegen die Tumorzellen gerichteten intakten Antikörper zeitversetzt verabreicht werden, um eine Immunisierung gegen den Tumor zu erzielen.

2. Verwendung nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Tumorzellen vor den Antikörpern oder die Antikörper vor den Tumorzellen verabreicht werden, wobei der Zeitraum zwischen der jeweiligen Verabreichung 1 - 48 Stunden beträgt.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Zeitraum 1 - 24 Stunden, bevorzugt 1 - 12 Stunden, weiterhin bevorzugt 1 - 6 Stunden oder 1 - 4 Stunden oder 2 - 4 Stunden beträgt.
4. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Antikörper in einer Menge, je bezogen auf eine Infusion, von 5 - 500 µg, bevorzugt 10 - 300 µg, weiterhin bevorzugt 10 - 100 µg oder 10 - 50 µg, und die Tumorzellen in einer Menge, bezogen auf eine Infusion, von 10^7 - 10^9 Zellen, bevorzugt ca. 10^8 Zellen, verabreicht werden.
5. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Antikörper so ausgewählt werden, daß sie über ihren Fc-Teil bei bispezifischen Antikörpern oder über ihren spezifischen Bindungsarm bei trispezifischen Antikörpern

zur Bindung Fc-Rezeptor positiver Zellen befähigt sind, die einen Fc γ -Rezeptor I, II oder III aufweisen.

6. Verwendung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper zur Bindung an Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, "Natural Killer"-Zellen (NK-Zellen) und/oder aktivierte neutrophile Zellen als Fc γ -Rezeptor I + III positive Zellen befähigt sind.
7. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper zur Induktion von tumorreaktiven Komplement-bindenden Antikörpern und damit zur Induktion einer humoralen Immunantwort befähigt sind.
8. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper so ausgewählt werden, daß sie über CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD28 und/oder CD44 an die T-Zellen binden.
9. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper so ausgewählt werden, daß nach ihrer Bindung an die Fc-Rezeptor positiven Zellen die Expression von CD40, CD80, CD86, ICAM-1 und/oder LFA-3 als kostimulatorische Antigene und/oder die Sekretion von Zytokinen durch die Fc-Rezeptor positive Zelle initiiert oder erhöht wird.
10. Verwendung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper so ausgewählt werden, daß die Sekretion

von IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, INF- γ als Zytokine und/oder von TNF- α erhöht wird.

11. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß der bispezifische Antikörper so ausgewählt wird, daß er ein anti-CD3 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/-oder anti-CD4 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD5 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD6 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD8 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD2 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD28 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD44 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen-Antikörper ist.
12. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß der bispezifische Antikörper aus einer oder mehreren der nachfolgenden Isotypkombinationen ausgewählt wird:

Ratte-IgG2b/Maus-IgG2a,

Ratte-IgG2b/Maus-IgG2b,

Ratte-IgG2b/Maus-IgG3,

Ratte-IgG2b/Human-IgG1,

Ratte-IgG2b/Human-IgG2,

Ratte-IgG2b/Human-IgG3[orientaler Allotyp G3m(st) = Bindung an Protein A],

Ratte-IgG2b/Human-IgG4,

Ratte-IgG2b/Ratte-IgG2c,

Maus-IgG2a/Human-IgG3[kaukasische Allotypen G3m(b+g) = keine Bindung an Protein A, im folgenden mit * gekennzeichnet]

Maus-IgG2a/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Maus-IgG2a/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Maus-IgG2a/Human-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG4/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG4[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3*[C-terminale Region von CH2: > AS-Position 251]-Human-IgG3*[CH3]

Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge-CH2-CH3]

Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG2-[Hinge-CH2-CH3]

Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG3-[Hinge-CH2-CH3, orientaler Allotyp]

Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge-CH2-CH3]

Human-IgG1/Human-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG4[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3*[C-terminale Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3*[CH3]

Human-IgG1/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG4[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3*[C-terminale Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3*[CH3]

Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG2[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3*[C-terminale Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3*[CH3]

Human-IgG1/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG2[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3*[C-terminale Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3*[CH3]

Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Human-IgG1/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Human-IgG2/Human-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG2-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Human-IgG4/Human-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Human-IgG4/Human-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG4[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3*[C-terminale Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3*[CH3]

Maus-IgG2b/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Maus-IgG2b/Human-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Maus-IgG2b/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG4/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG4-[CH2]-Human-IgG3*-[CH3]

HumanIgG1/Ratte[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1[Hinge]-Human-IgG4-[CH2]-HumanIgG3*[CH3]

HumanIgG1/Maus[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1[Hinge]-Human-IgG4-[CH2]-Human-IgG3*[CH3]

Human-IgG4/Human[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG4-[CH2]-HumanIgG3*-[CH3]

13. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß der bispezifische Antikörper aus einem heterologen
bispezifischen oder trispezifischen Antikörper, bevorzugt
einem heterologen Ratte/Maus bispezifischen Antikörper,
ausgewählt wird.
14. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß der trispezifische Antikörper einen T-Zell-Bindungsarm,
einen Tumorzell-Bindungsarm und eine dritte Spezifität
zur Bindung an Fc-Rezeptor positive Zellen besitzt.
15. Verwendung nach Anspruch 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß der trispezifische Antikörper so ausgewählt wird, daß
er ein anti-CD3 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/-
oder anti-CD4 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder
anti-CD5 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-
CD6 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD8 X
anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD2 X anti-
Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD28 X anti-Tu-
mor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD44 X anti-Tumor-
assoziiertes Antigen-Antikörper ist.

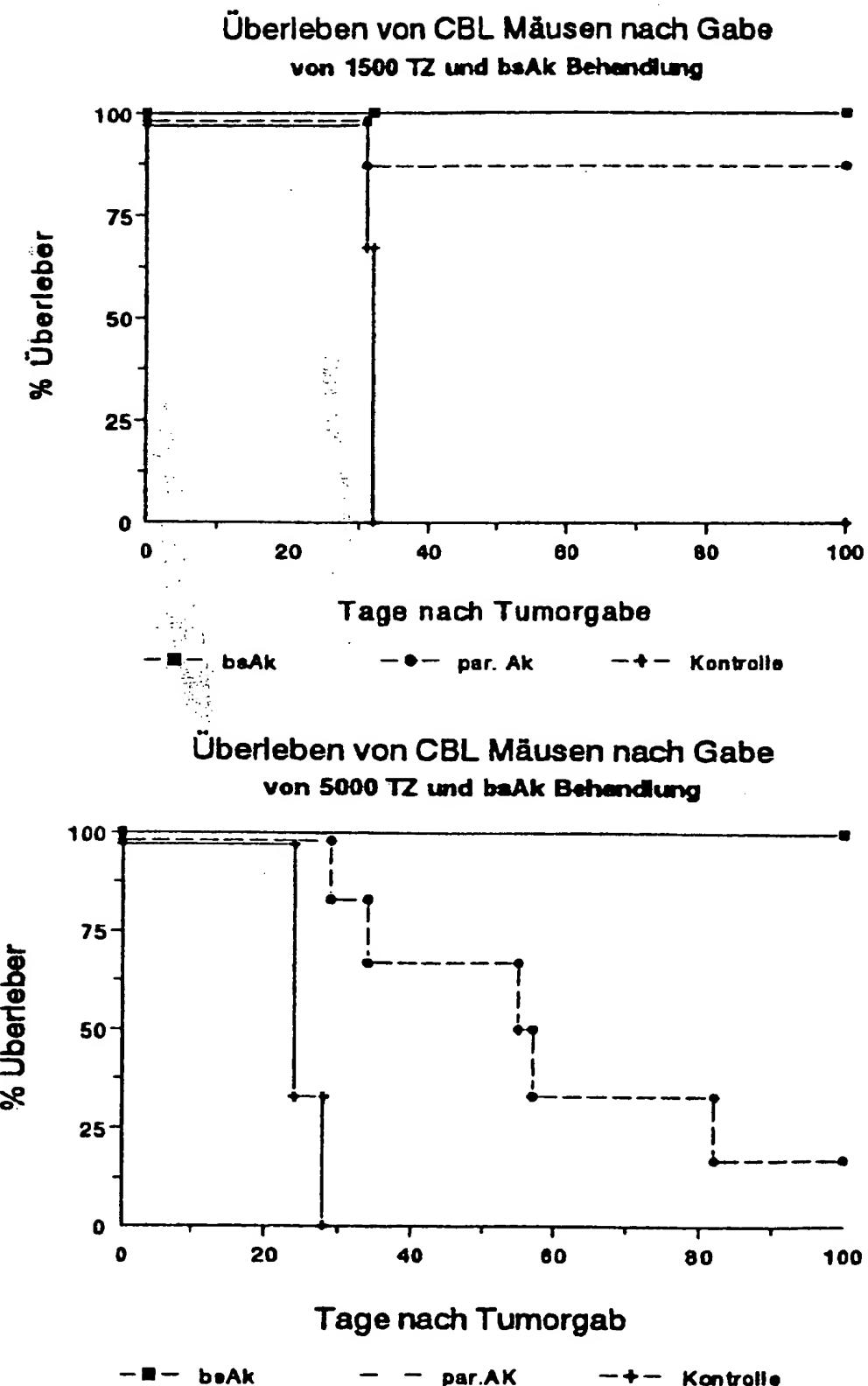
21. Verwendung nach Anspruch 20,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Antikörper gegen solche Zielantigene gerichtet
ist, die nach Induktion auf der Zielzelle in einer Anzahl
von mindestens 100 und höchstens 500.000 pro Zielzelle
vorliegen.
22. Verwendung nach Anspruch 21,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Antikörper weiterhin so ausgewählt wird, daß er
zur Aktivierung Fc-Rezeptor positiver Zellen befähigt ist,
wodurch die Expression von Cytokinen und/oder co-stimmu-
latorischen Antigenen initiiert oder erhöht wird.
23. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden
Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die zeitlich abgestufte Anwendung der intakten bispe-
zifischen und/oder trispezifischen Antikörper zur Verbes-
serung des Immunisierungserfolges mehrfach erfolgt.

16. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß Tumorzellen eingesetzt werden, die durch Bestrahlung,
bevorzugt durch γ -Bestrahlung, weiterhin bevorzugt in einer
Dosisstärke von 50 bis 200 Gy, oder durch chemische
Substanzen, bevorzugt Mitomycin C, behandelt wurden.
17. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Antikörper so ausgewählt ist, daß er an ein Oberflächenantigen als Zielantigen auf der Zielzelle bindet,
welches induzierbar ist und im nicht induzierten Zustand
(Normalzustand) auf der Zielzelle nicht vorkommt oder in
einer derart geringen Zahl, daß die Anzahl für eine Zerstörung
der Zielzelle durch den Antikörper nicht ausreicht.
18. Verwendung nach Anspruch 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß zur Steigerung der Immunogenität der Tumorzellen diese
vor Verabreichung einer Hitzevorbehandlung unterzogen werden.
19. Verwendung nach Anspruch 17 oder 18,
dadurch gekennzeichnet,
daß als induzierbare Antigene Hitze-Schock-Proteine oder
MHC-Klasse-I verwandte MIC-Moleküle eingesetzt werden.
20. Verwendung nach einem der Ansprüche 17 bis 19,
dadurch gekennzeichnet,
daß als Hitze-Schock-Proteine HSP25-, HSP60- oder HSP70-
(HSP72-) oder HSP90-Proteine und als MIC-Moleküle
MIC-A- und MIC-B-Moleküle eingesetzt werden.

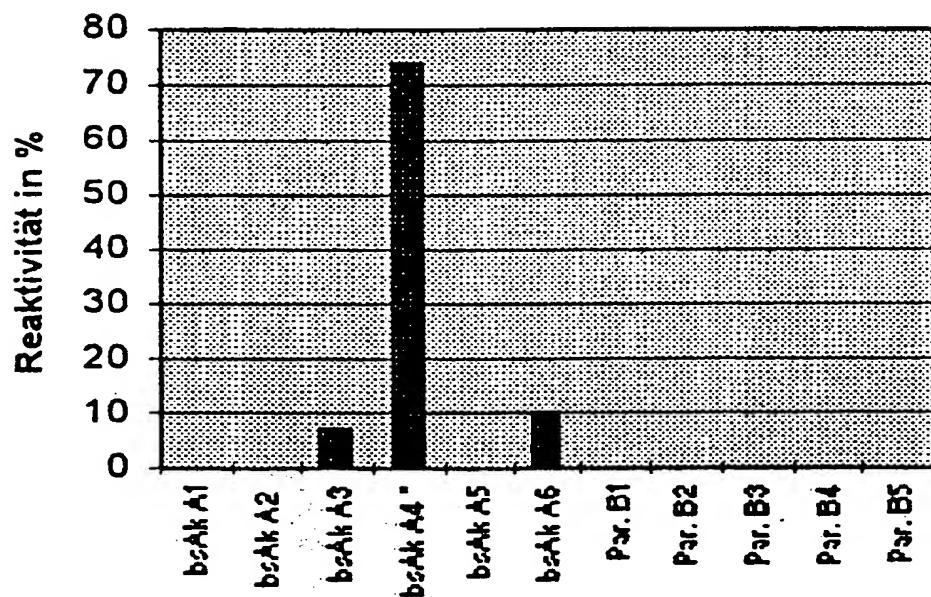
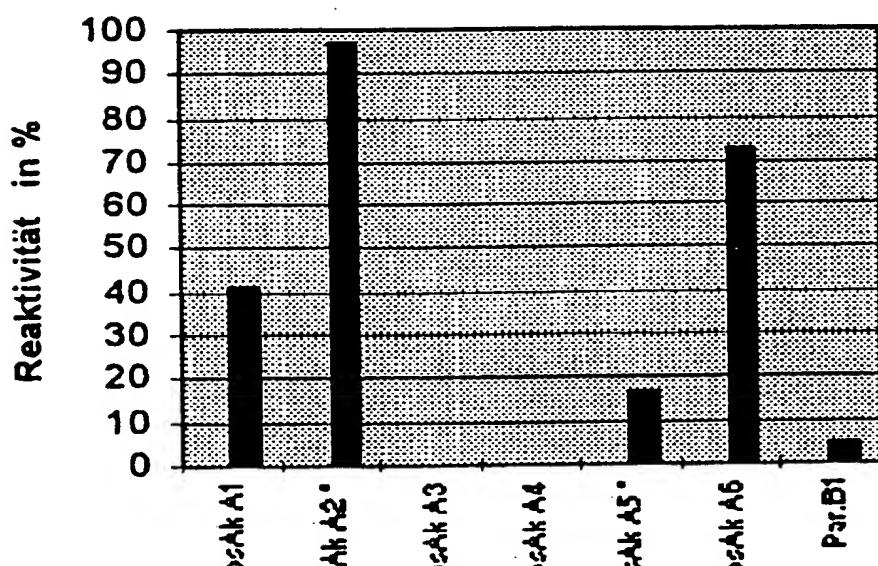
THIS PAGE BLANK (USPTO)

1/8

Abb. 1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

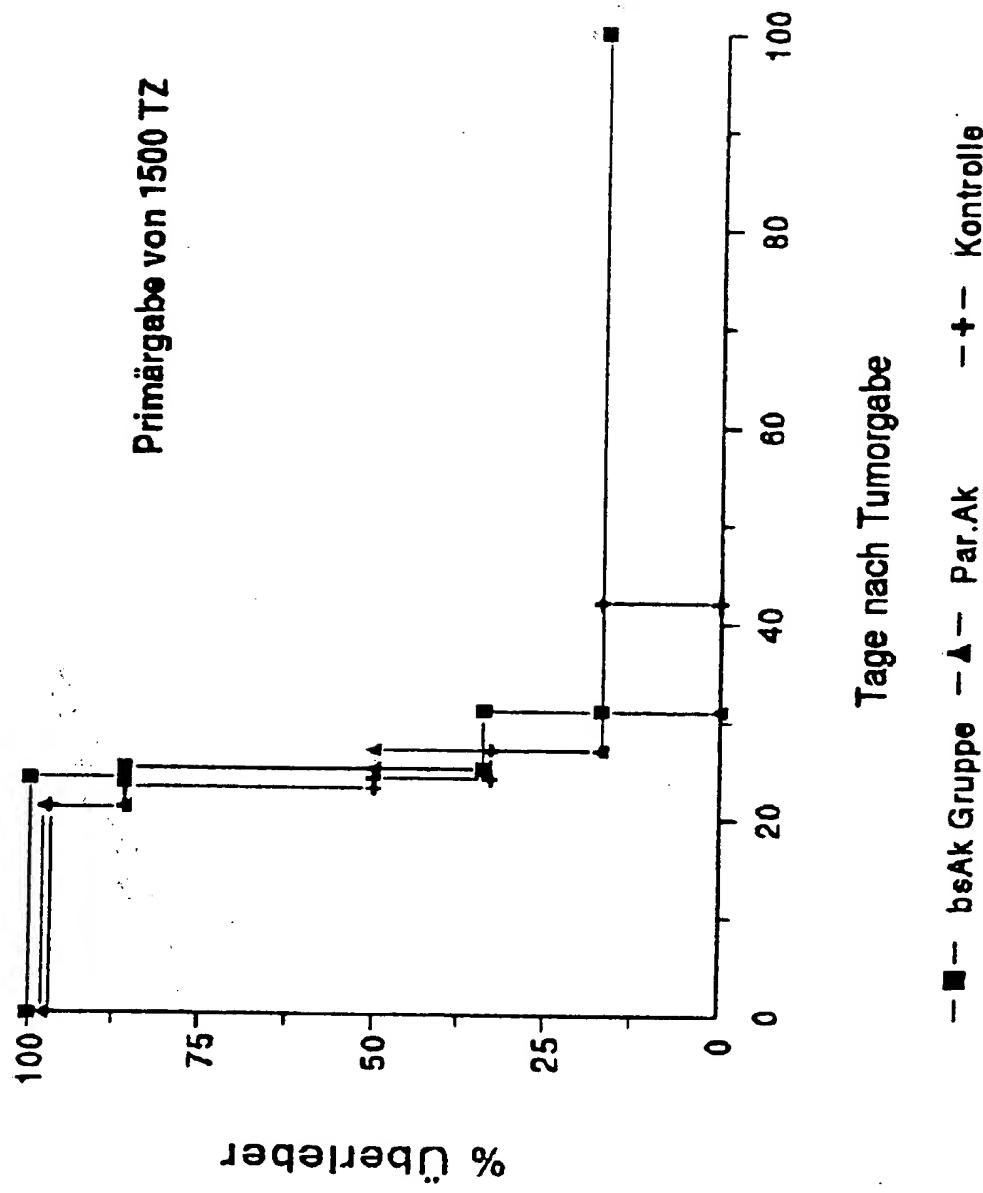
Abb. 2**Humorale Antwort nach 1500 TZ****Humorale Antwort nach 5000 TZ**

THIS PAGE BLANK (usFTO)

3 / 8

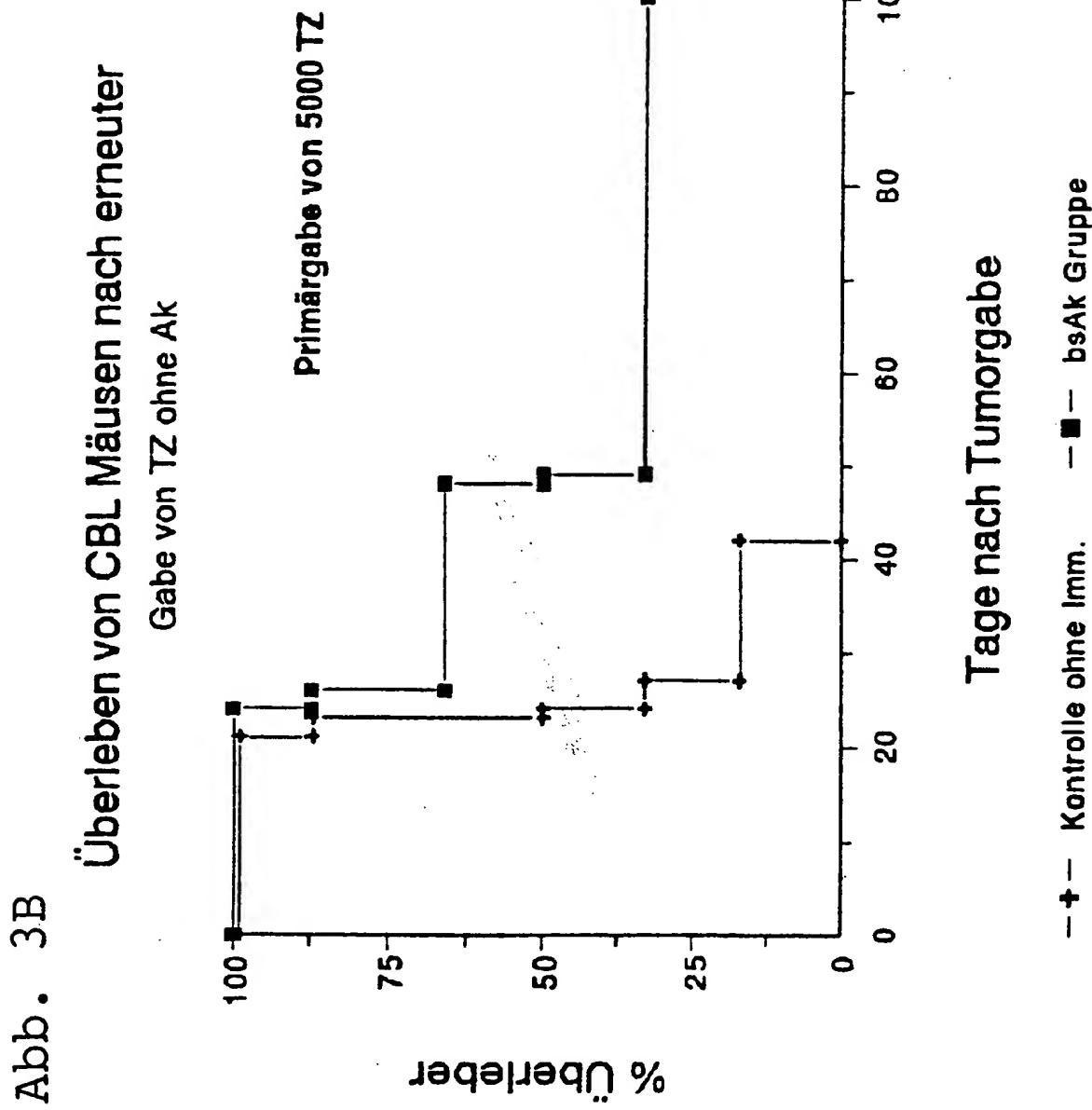
Abb. 3 A

Überleben von CBL Mäusen nach erneuter
Gabe von TZ ohne Ak



THIS PAGE BLANK (USPTO)

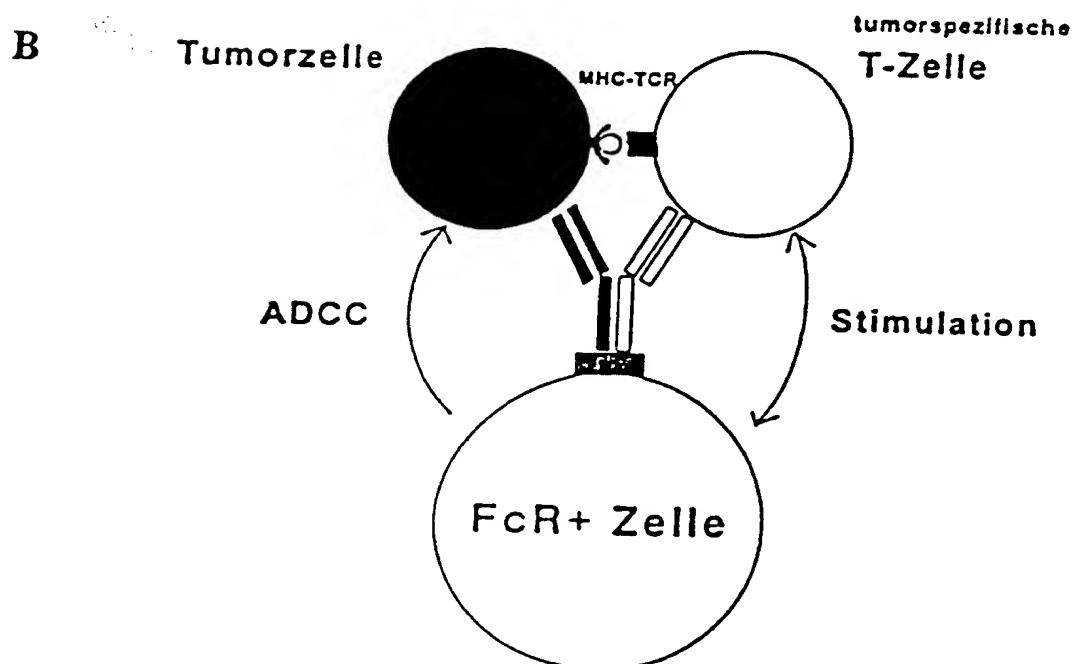
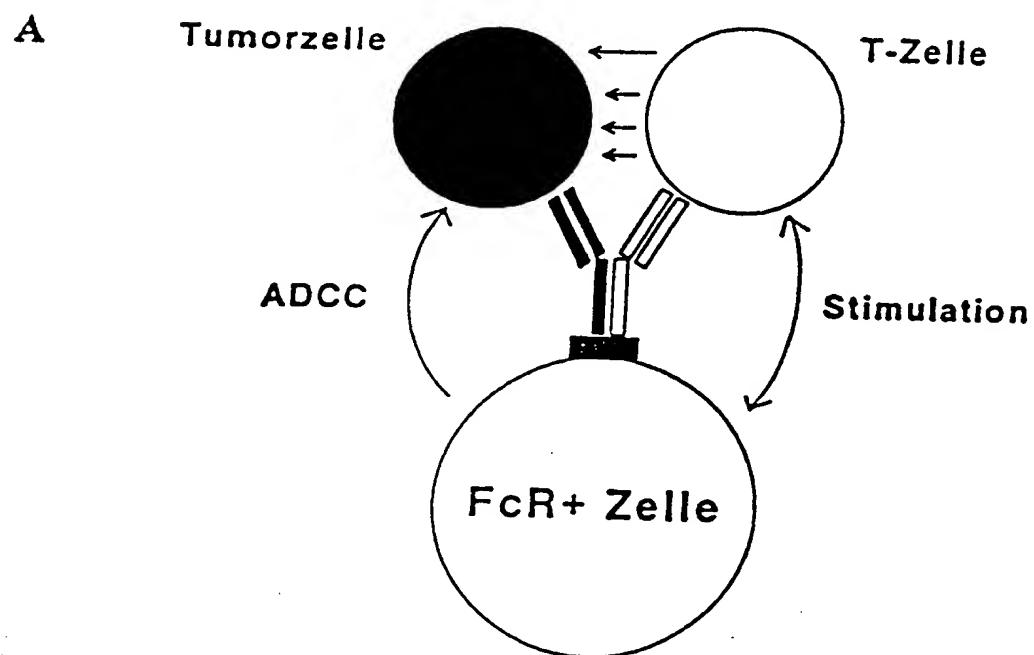
4 / 8



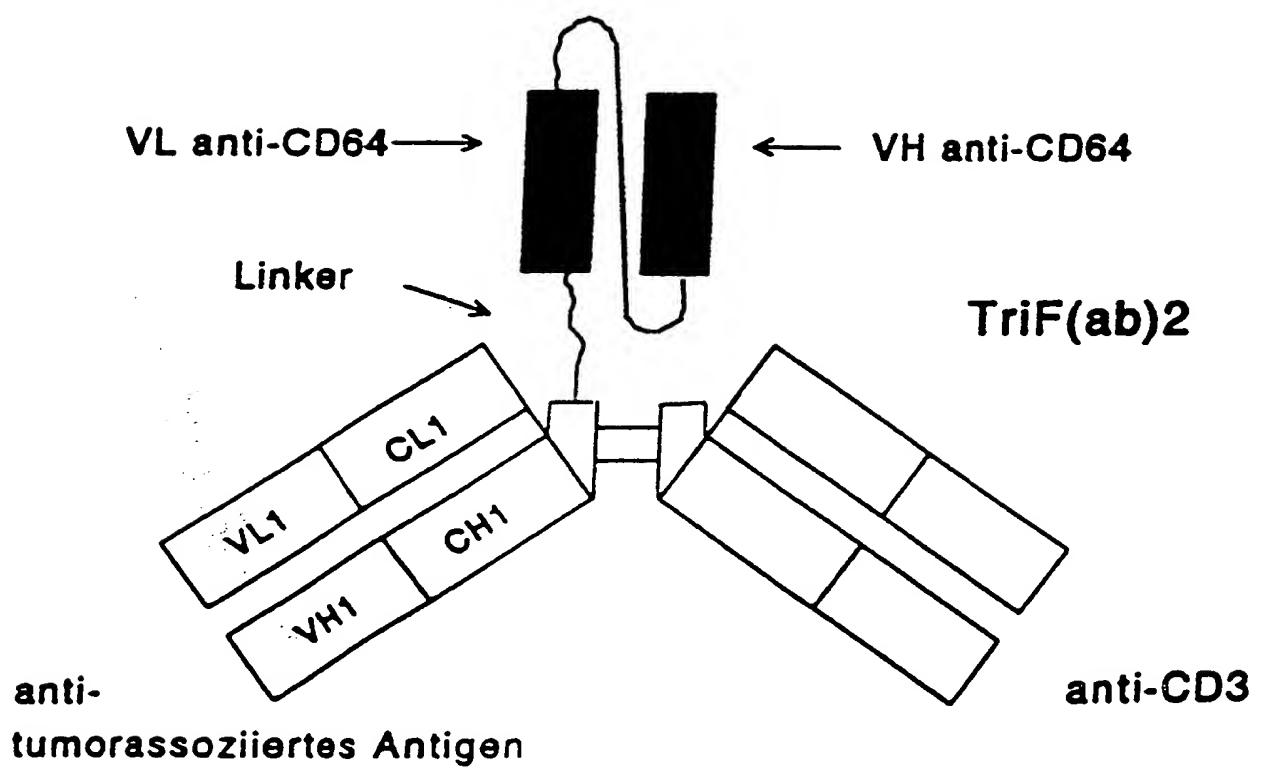
THIS PAGE BLANK (USPTO)

5/8
Abb.4

Die Rolle von akzessorischen Zellen bei der Tumor-Immuntherapie
mittels bispezifischer Antikörper

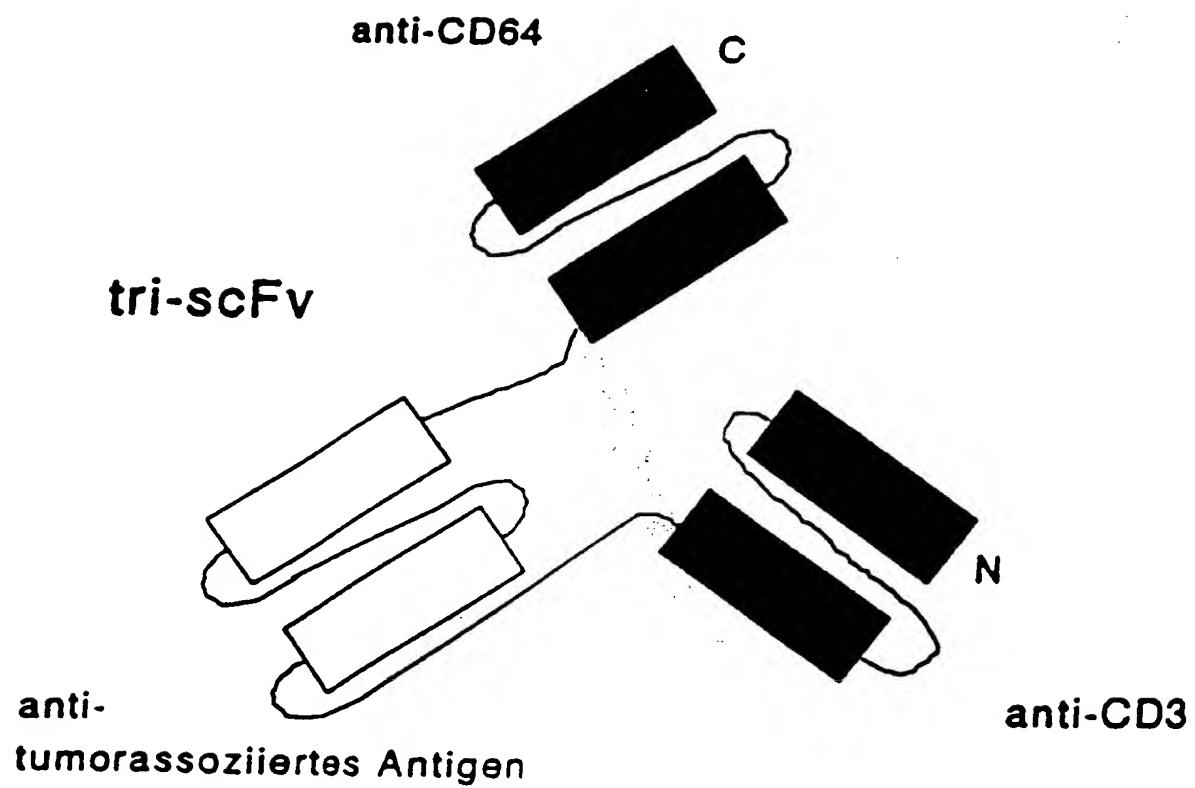


THIS PAGE BLANK (USPTO)

ABBILDUNG 5

THIS PAGE BLANK (USPTO)

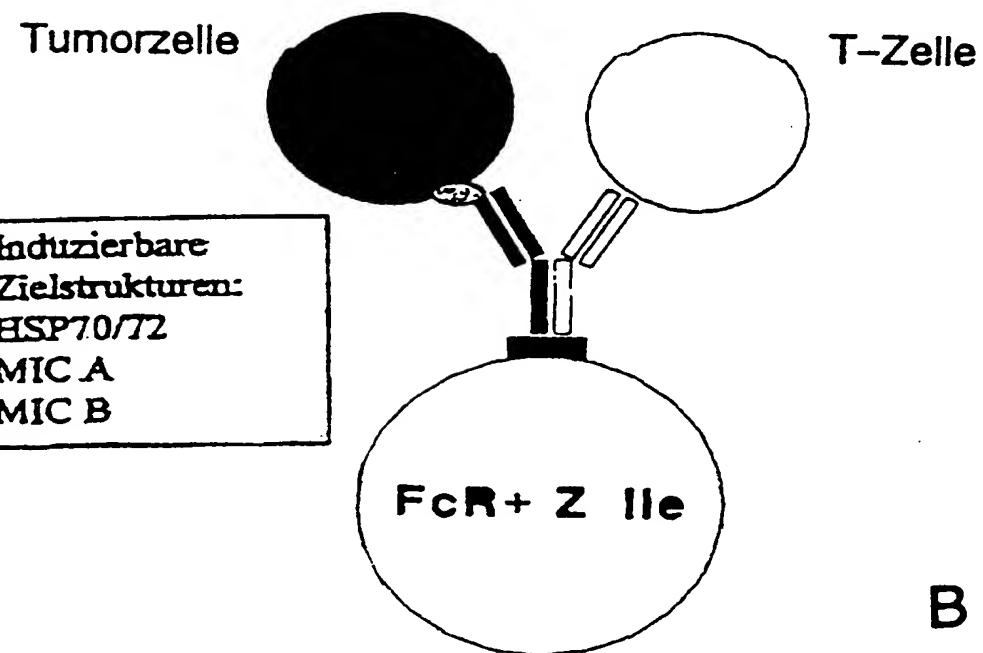
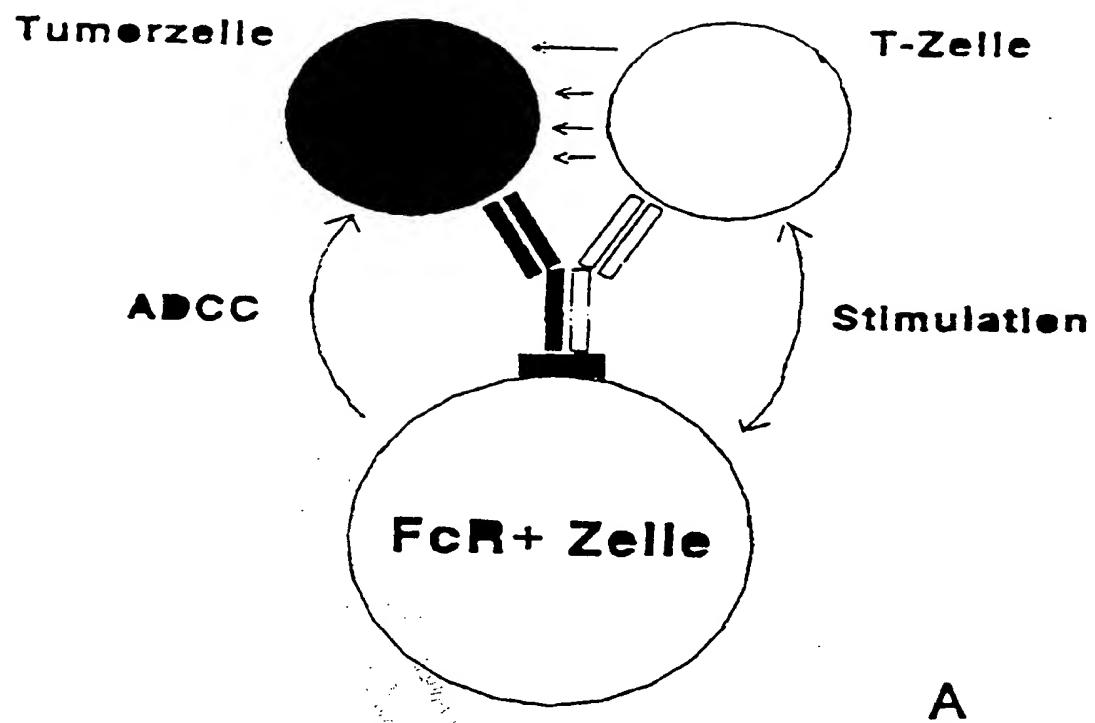
7/8

ABBILDUNG 6

THIS PAGE BLANK (USPTO)

8/8

Abb. 7 A + B



THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/07094

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K39/395 A61K35/14 //C07K16/42, C07K16/28, C07K16/30

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>LINDHOFER H ET AL: "BISPECIFIC ANTIBODIES TARGET OPERATIONALLY TUMOR-SPECIFIC ANTIGENS IN TWO LEUKEMIA RELAPSE MODELS" BLOOD, US, PHILADELPHIA, PA, vol. 88, no. 12, 15 December 1996 (1996-12-15), pages 4651-4658, XP000616201 ISSN: 0006-4971 abstract page 4654, left-hand column, paragraph 2 -page 4655, left-hand column, paragraph 1</p>	1,4-16, 23
Y		17-22 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the International filing date
- "L" document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

24 February 2000

Date of mailing of the International search report

15/03/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 6816 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Covone, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intel  Patent Application No.

PCT/EP 99/07094

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>CAMPBELL F A ET AL: "The role of tumor rejection antigens in host antitumor defense mechanisms."</p> <p>CANCER, (1995 JUN 1) 75 (11) 2649-55. REF: 88 , XP000877103</p> <p>page 2649, left-hand column, line 21-25</p> <p>page 2651, left-hand column, line 23-49</p> <p>page 2652, left-hand column, line 34</p> <p>-right-hand column, line 40</p>	17-22
X	<p>LINDHOFER H ET AL: "BISPECIFIC ANTIBODIES EFFECTIVELY PURGE CANCER CELLS FROM PERIPHERAL BLOOD STEM CELL COLLECTIONS WITHOUT AFFECTING COLONY FORMING UNITS"</p> <p>ANNUAL MEETING INTERNATIONAL SOCIETY FOR EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, XX, XX,</p>	1,5-16, 23
	<p>vol. 25, no. 8,</p> <p>24 August 1997 (1997-08-24), page 879</p>	
XP002048523		
the whole document		
X	<p>DE 197 10 497 A (GSF FORSCHUNGSZENTRUM UMWELT) 5 March 1998 (1998-03-05)</p>	1,5-16, 23
cited in the application		
page 2, line 35 -page 3, line 6		
page 5, line 25-37		
example ALL		
P,X	<p>EP 0 885 614 A (GSF FORSCHUNGSZENTRUM UMWELT) 23 December 1998 (1998-12-23)</p>	1-16,23
column 3, line 26-37		
example 2		
claims		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 99/07094

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Observation: Although Claims 1-23 relate to a method for treatment of the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int'l Search Application No

PCT/EP 99/07094

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
DE 19710497	A 05-03-1998	EP	0826696 A	04-03-1998
		JP	10182487 A	07-07-1998
		DE	19649223 A	05-03-1998
		EP	0826695 A	04-03-1998
		JP	10179151 A	07-07-1998
		US	5985276 A	16-11-1999
EP 0885614	A 23-12-1998	DE	19725586 A	24-12-1998
		JP	11071288 A	16-03-1999

INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/07094

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K39/395 A61K35/14 //C07K16/42, C07K16/28, C07K16/30

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)
IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	LINDHOFER H ET AL: "BISPECIFIC ANTIBODIES TARGET OPERATIONALLY TUMOR-SPECIFIC ANTIGENS IN TWO LEUKEMIA RELAPSE MODELS" BLOOD, US, PHILADELPHIA, PA, Bd. 88, Nr. 12, 15. Dezember 1996 (1996-12-15), Seiten 4651-4658, XP000616201 ISSN: 0006-4971 Zusammenfassung Seite 4654, linke Spalte, Absatz 2 -Seite 4655, linke Spalte, Absatz 1	1, 4-16, 23
Y	—/—	17-22

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldeatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldeatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldeatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzip oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfundenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfundenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

Anmeldeatum des Internationalen Recherchenberichts

24. Februar 2000

15/03/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 91 651 epo nl.
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Covone, M

INTERNATIONALER RECHENBERICHT

Intern ~~Albenzeichen~~

PCT/EP 99/07094

C(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGEGEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	CAMPBELL F A ET AL: "The role of tumor rejection antigens in host antitumor defense mechanisms." CANCER, (1995 JUN 1) 75 (11) 2649-55. REF: 88 , XP000877103 Seite 2649, linke Spalte, Zeile 21-25 Seite 2651, linke Spalte, Zeile 23-49 Seite 2652, linke Spalte, Zeile 34 -rechte Spalte, Zeile 40	17-22
X	LINDHOFER H ET AL: "BISPECIFIC ANTIBODIES EFFECTIVELY PURGE CANCER CELLS FROM PERIPHERAL BLOOD STEM CELL COLLECTIONS WITHOUT AFFECTING COLONY FORMING UNITS" ANNUAL MEETING INTERNATIONAL SOCIETY FOR EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, XX,XX, Bd. 25, Nr. 8, 24. August 1997 (1997-08-24), Seite 879 XP002048523 das ganze Dokument	1,5-16, 23
X	DE 197 10 497 A (GSF FORSCHUNGSZENTRUM UMWELT) 5. März 1998 (1998-03-05) in der Anmeldung erwähnt Seite 2, Zeile 35 -Seite 3, Zeile 6 Seite 5, Zeile 25-37 Beispiel ALL	1,5-16, 23
P,X	EP 0 885 614 A (GSF FORSCHUNGSZENTRUM UMWELT) 23. Dezember 1998 (1998-12-23) Spalte 3, Zeile 26-37 Beispiel 2 Ansprüche	1-16,23

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/07094

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl die Ansprüche 1-23 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der Internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine einvolle Internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgetastet sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese Internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser Internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser Internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der Internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt.

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationale Aktenzeichen

PCT/EP 99/07094

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DE 19710497 A	05-03-1998	EP	0826696 A	04-03-1998
		JP	10182487 A	07-07-1998
		DE	19649223 A	05-03-1998
		EP	0826695 A	04-03-1998
		JP	10179151 A	07-07-1998
		US	5985276 A	16-11-1999
EP 0885614 A	23-12-1998	DE	19725586 A	24-12-1998
		JP	11071288 A	16-03-1999

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference P11655 Dr.B/La	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP99/07094	International filing date (day/month/year) 22 September 1999 (22.09.99)	Priority date (day/month/year) 25 September 1998 (25.09.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 39/395, 35/14, C07K 16/42, 16/28, 16/30		
Applicant LINDHOFER, Horst		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 18 April 2000 (18.04.00)	Date of completion of this report 07 July 2000 (07.07.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/07094

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

 the international application as originally filed. the description, pages 1-30, as originally filed,
pages _____, filed with the demand,
pages _____, filed with the letter of _____,
pages _____, filed with the letter of _____. the claims, Nos. 1-23, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. _____, filed with the letter of _____,
Nos. _____, filed with the letter of _____. the drawings, sheets/fig 1/6-6/6, as originally filed,
sheets/fig _____, filed with the demand,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

 the description, pages _____
 the claims, Nos. _____
 the drawings, sheets/fig _____

3. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/07094

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

the entire international application.

claims Nos. 1-23 with respect to industrial applicability.

because:

the said international application, or the said claims Nos. 1-23 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (specify):

See separate sheet

the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (specify):

the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

no international search report has been established for said claims Nos. _____

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 99/07094

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III

Claims 1-23 relate to subject matter which, in the view of the International Preliminary Examining Authority, falls within the scope of PCT Rule 67.1(iv). Therefore no expert report is established regarding the industrial applicability of the subject matter of these claims (PCT Article 34(4)(a)(i)).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-23	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-23	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims		YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

This report makes reference to the following documents:

D1: Blood, 88(12), 1996, 4651-4658
 D2: Annual Meeting International Society for
 Experimental Hematology, 25(8), 1997, page 879
 D3: DE-A-197 10 497.

a) Novelty and inventive step

Claim 1 and dependent Claims 2-23 relate to a process for the active immunisation of patients against tumour cells. According to this process, treated tumour cells which are not capable of surviving following reinfusion are injected into the patient; the immunisation effect is strengthened by administering bispecific antibodies whose T cells are directed specifically against the tumour cells. Since the use of bispecific antibodies as well as treated non-viable tumour cells is crucial to this method, the subject matter of Claim 1 differs from that of the X category documents cited in the international search report. Whilst documents D1-D3 relate to the use of bispecific antibodies for combating tumours, none of these documents suggests the reinfusion of treated non-viable tumour cells. In D1 and D3 (see sections cited in the search report) tumor

THIS PAGE BLANK (USPTO)

cells are injected into an animal, but these are not treated cells intended to contribute to an active immunisation, but rather untreated, normally proliferating tumour cells which are injected in order to establish a tumour model and subsequently test the use of bispecific antibodies. Bispecific antibodies are used in D2 to cleanse ex vivo peripheral stem cells used in hematopoietic reconstruction following chemotherapy of contaminated tumour cells; treated non-viable tumour cells are not injected.

Therefore the subject matter of Claim 1 appears to be novel (PCT Article 33(2)). Since none of the documents contains any indication of the use of treated non-viable tumour cells in combination with bispecific antibodies to facilitate an active immunisation, Claim 1 also appears to meet the requirements of PCT Article 33(3).

Dependent Claims 2-23 relate to preferred embodiments of the novel and inventive method from Claim 1, and therefore also meet the requirements of PCT Article 33(2) and 33(3).

b) Industrial applicability

The PCT does not contain uniform criteria for assessing the industrial applicability of present Claims 1-23. Patentability may depend on the wording of the claims. The EPO, for example, does not recognise the industrial applicability of claims to the use of a compound in a medical treatment; it does, however, allow claims to the first use of a known compound in a medical treatment or the use of such a compound to manufacture a drug for a new medical treatment.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: VI

EP-A-0 885 614 (D4) was published on 23.12.1998, i.e. after the priority date (25.09.1998) of the present application. This document could therefore only be relevant if the claim to priority proved to be invalid for particular parts of the application. D4 discloses a process for immunisation against tumours which includes the following steps:

- a) isolating autologous tumour cells
- b) treating the tumour cells so as to prevent their survival following reinfusion
- c) incubating the tumour cells thus treated with intact bispecific or trispecific antibodies
- d) reinfusing the antibody-carrying tumour cells.

The antibodies used in D4 are identical with the antibodies according to the present invention.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM
GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts P11655 Dr.B/La	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/07094	Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr) 22/09/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 25/09/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK A61K39/395		
Anmelder LINDHOFER, Horst et al		
<p>1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p><input type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor der Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).</p> <p>Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.</p>		
<p>3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Berichts II <input type="checkbox"/> Priorität III <input checked="" type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit IV <input type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung V <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderliche Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung VI <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen VII <input type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung VIII <input type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung 		

Datum der Einreichung des Antrags 18/04/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 07.07.2000
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter von Ballmoos, P Tel. Nr. +49 89 2399 8174



THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/07094

I. Grundlag d s Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-30 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-23 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/6-6/6 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- Beschreibung, Seiten:
- Ansprüche, Nr.:
- Zeichnungen, Blätter:

3. Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erforderlicher Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- die gesamte internationale Anmeldung.
- Ansprüche Nr. 1-23 with respect to industrial applicability.

Begründung:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/07094

Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 1-23 beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):

siehe Beiblatt

Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):

Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.

Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 1-23
	Nein: Ansprüche ---
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche 1-23
	Nein: Ansprüche ---
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche ---
	Nein: Ansprüche ---

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Teil III

Die Ansprüche 1-23 beziehen sich auf einen Gegenstand, der nach Auffassung dieser Behörde unter die Regel 67.1 (iv) PCT fällt. Daher wird über die gewerbliche Anwendbarkeit des Gegenstands dieser Ansprüche kein Gutachten erstellt (Artikel 34(4) a) (i) PCT).

Teil V

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

- D1 Blood, 88(12), 1996, 4651-4658
- D2 Annual Meeting International Society for Experimental Hematology, 25(8), 1997, S. 879
- D3 DE-A-197 10 497

a) Neuheit und erfinderische Tätigkeit

Anspruch 1 und die davon abhängigen Ansprüche 2-23 betreffen ein Verfahren zur aktiven Immunisierung von Patienten gegen Tumorzellen. Dazu werden behandelte Tumorzellen, die nach der Reinfusion in den Patienten nicht überleben können, injiziert; der Immunisierungseffekt wird verstärkt, indem spezifische Antikörper verabreicht werden, welche T-Zellen spezifisch gegen diese Tumorzellen richten.

Dadurch, dass sowohl der Einsatz spezifischer Antikörper als auch behandelter, nicht-überlebensfähiger Tumorzellen für die Methode entscheidend sind, unterscheidet sich der Gegenstand von Anspruch 1 von den im Internationalen Recherchenbericht als X zitierten Dokumenten. Die Dokumente D1-D3 betreffen zwar den Einsatz spezifischer Antikörper zur Tumorbekämpfung, aber keines dieser Dokumente beinhaltet die Reinfusion behandelter, nicht-überlebensfähiger Tumorzellen.

In D1 und D3 (siehe die im Recherchenbericht erwähnten Stellen) werden zwar Tumorzellen in das Tier injiziert, doch handelt es sich nicht um behandelte Zellen, die zu einer aktiven Immunisierung beitragen sollen, sondern es werden unbehandelte, normal proliferierende Tumorzellen injiziert, um ein Tumormodell zu etablieren und danach den Einsatz spezifischer Antikörper zu testen. In D2 werden die

THIS PAGE BLANK (USPTO)

bispezifischen Antikörper verwendet, um periphere Blutstammzellen, welche zur hämatopoietischen Rekonstitution nach Chemotherapie verwendet werden, von kontaminierenden Tumorzellen ex vivo zu reinigen; behandelte, nicht-lebensfähige Tumorzellen werden nicht injiziert.

Der Gegenstand des Anspruchs 1 scheint deshalb neu zu sein (Art. 33(2) PCT). Da keines der Dokumente einen Hinweis enthält auf die Verwendung behandelter nicht-lebensfähiger Tumorzellen in Kombination mit bispezifischen Antikörpern um eine aktive Immunisierung zu ermöglichen, scheint Anspruch 1 auch die Erfordernisse des Art. 33(3) PCT zu erfüllen.

Die abhängigen Ansprüche 2-23 betreffen bevorzugte Ausführungsformen der neuen und erfinderischen Methode aus Anspruch 1 und genügen somit auch den Erfordernissen der Art. 33(2) und (3) PCT.

b) Gewerbliche Anwendbarkeit

Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände der vorliegenden Ansprüche 1-23 gewerblich anwendbar sind, gibt es in den PCT-Vertragsstaaten keine einheitlichen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.

Teil VI

EP-A-0 885 614 (D4) ist am 23.12.1998 und somit nach dem Prioritätsdatum (25.09.1998) veröffentlicht worden. Dieses Dokument könnte deshalb nur relevant werden, falls der Prioritätsanspruch sich als für gewisse Teile der Anmeldung nicht gültig erweisen würde. D4 offenbart ein Verfahren zur Immunisierung gegen Tumoren, das folgende Schritte umfasst:

a) Isolierung autologer Tumorzellen

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT - BEIBLATT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/07094

- b) Behandeln der Tumorzellen, um ihr Überleben nach Reinfusion zu verhindern
- c) Inkubation der so behandelten Tumorzellen mit intakten bi- oder trispezifischen Antikörpern
- d) Reinfusion der mit den Antikörpern beladenen Tumorzellen.

Die in D4 verwendeten Antikörper sind identisch mit den erfindungsgemäßen Antikörpern.

THIS PAGE BLANK (USPTO)